

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991561** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.31

(51) Int. Cl. **C07K 14/435 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2013.09.12

**(54) ОСНОВАННЫЕ НА ФИБРОНЕКТИНЕ КАРКАСНЫЕ ДОМЕННЫЕ БЕЛКИ,
КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С МИОСТАТИНОМ**

(31) **61/700,697; 61/780,005**

(32) **2012.09.13; 2013.03.13**

(33) **US**

(62) **201590543; 2013.09.12**

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Клоад Шерон, Энгл Линда,
Липовсек Даса, Мадиредди Малави,
Ракестроу Джинджер Чао, Свэйи
Джоанна, Чжао Вэньцзюнь, Вэй
Хуэй, Ямниук Аарон П. (US),
Рамамурти Видхашанкар (IN), Кожич
Александр Т., Корбетт Мартин Дж.,
Кристек Стенли Ричард Джр. (US)**

(74) Представитель:

**Глухарёва А.О., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к основанным на фибронектине каркасным доменным белкам, которые связываются с миостатином. Настоящее изобретение также относится к применению этих белков в терапевтических применениях для лечения мышечной дистрофии, кахексии, саркопении, остеоартрита, остеопороза, сахарного диабета, ожирения, хронического обструктивного заболевания легких, хронического заболевания почек, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда и фиброза. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам, содержащим такие белки, полинуклеотидам, кодирующим такие белки или их фрагменты, а также векторам, содержащим полинуклеотиды, кодирующие белки.

A2

201991561

201991561

A2

ОСНОВАННЫЕ НА ФИБРОНЕКТИНЕ КАРКАСНЫЕ ДОМЕННЫЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С МИОСТАТИНОМ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 61/700697, озаглавленной "Основанные на фибронектине каркасные доменные белки, которые связываются с миостатином", поданной 13 сентября 2012 г., и с предварительной заявкой на патент США №61/780005, озаглавленной "Основанные на фибронектине каркасные доменные белки, которые связываются с миостатином", поданной 13 марта 2013 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к основанным на фибронектине каркасным доменным белкам, которые связываются с миостатином. Настоящее изобретение также относится к использованию инновационных белков в терапевтических применениях для лечения связанных с мышечной слабостью заболеваний и нарушений обмена веществ. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам, содержащим такие белки, кодирующие такие белки или их фрагменты полинуклеотиды, а также к векторам, содержащим полинуклеотиды, кодирующие инновационные белки.

Уровень техники

Миостатин, также известный как фактор-8 роста и дифференцировки (GDF-8), представляет собой представителя суперсемейства трансформирующих факторов роста- β (TGF- β) секретируемых факторов роста. Миостатин характеризуется всеми структурными особенностями, общими для белков семейства TGF- β : гидрофобным аминоконцом, который действует как секреторный сигнал, девятью инвариантными остатками цистеина и протеолитическим сайтом процессинга типа фурин "RXXR". Протеолитическое расщепление белка приводит к образованию С-концевого домена, который образует гомодимер, который представляет собой биологически активную форму миостатина (Thies et al., *Growth Factors* 2001;18(4):251-9). Выравнивания С-

концевого фрагмента аминокислотных последовательностей миостатина от множества видов позвоночных показывают, что белок характеризуется высокой консервативностью (100% идентичностью) между человеком, обезьяной, коровой, собакой, мышью, крысой, индейкой и курицей (McPherron, et al. PNAS, 94:12457-61, 1997).

Экспрессия миостатина ограничивается в основном скелетной мускулатурой и жировой тканью, где было показано, что он представляет собой негативный регулятор развития скелетных мышц (Lee LS, *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 2010;10:183-194). У млекопитающих, скелетная мускулатура, по-видимому, представляет собой основную ткань-мишень миостатина, где он связывается с рецепторами клеточной поверхности, приводя к потере мышечной массы. Мыши и крупный рогатый скот с генетическими недостатками в миостатине демонстрируют резкое увеличение массы скелетных мышц, т.е. фенотип "гипертрофии мышц", таким образом, подтверждая роль миостатина в подавлении роста мышц (McPherron and Lee, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15842-6). Гипертрофия мышц у таких пород крупного рогатого скота, как Belgian Blue и Piedmontese, связана с миссенс мутацией в третьем экзоне бычьего гена миостатина (Bass et. al., *Domest Anim Endocrinol.* 1999;17(2-3):191-7). Трансгенная избыточная экспрессия ингибиторов миостатина также приводит к гипертрофированной мускулатуре. Усиленный рост мышц у этих животных связан с увеличением как числа клеток, или гиперпластическим ростом, так и размером клеток, или гипертрофическим ростом, что приводит к более крупным и более тяжелым мышечным волокнам. Увеличение массы скелетных мышц вследствие мутации миостатина также сообщалась у людей. Ингибирование миостатина эффективно увеличивает скелетную мышечную массу и силу, как в постнатальном периоде, так и у взрослых.

Увеличение массы и силы скелетных мышц также связано с метаболическими адаптациями, которые положительно влияют на конституцию, расход энергии, гомеостаз глюкозы и потребность в инсулине. Как генетические, так и фармакологические данные показывают, что миостатин регулирует энергетический метаболизм и что его ингибирование может значительно ослаблять прогрессирование заболеваний обмена веществ, включающих в себя ожирение и сахарный диабет. Например, миостатиновые нулевые мыши проявляют уменьшенное накопление жира в организме (McPherron & Lee, J. JCI 109: 595, 2002), по сравнению с мышами дикого типа того же возраста. Это сокращение жира в организме представляет собой

проявление уменьшенного количества и размера адипоцитов, подразумевая значительную роль миостатина в адипогенезе, а также в миогенезе.

Соответственно, миостатин представляет собой желательную мишень для терапевтического или профилактического вмешательства для лечения нарушений или состояний, которые бы получили пользу от увеличения мышечной массы, силы мышц и/или метаболизма (например, мышечная дистрофия, слабость, дисфункциональная атрофия и кахексия), нарушений, связанных с атрофией мышц (например, почечная недостаточность, сердечная недостаточность или заболевание и заболевание печени) и нарушений обмена веществ (например, сахарный диабет типа II, метаболический синдром, ожирение и остеоартрит).

Соответственно, было бы выгодно получать улучшенные фибронектиновые каркасные доменные белки, которые связывают миостатин для терапевтического лечения, например, нарушений обмена веществ, нарушений, связанных с мышечной атрофией, а также потерей мышечной массы из-за неактивности.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии аднектинов, которые связываются с и представляют собой антагонистов миостатина. В частности, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют активность миостатина, тем самым оказывая влияние на последующую передачу сигналов SMAD. Один механизм учета измененной передачи сигналов SMAD некоторых антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению включает в себя ингибирование вовлечения Alk4 в комплекс миостатин-ActRIIb, физиологические последствия которого увеличивают объем мышц и вес тела.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен полипептид, содержащий десятый домен фибронектина типа III (¹⁰F_n3), причем ¹⁰F_n3 содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли человеческого домена ¹⁰F_n3, и причем полипептид связывается с миостатином. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид связывается с миостатином с K_D, составляющей менее чем 500 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC полипептида согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₁-L-P-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇, где (a) X₁ выбирают из

группы, состоящей из S, T и Y; (b) X_2 выбирают из группы, состоящей из H, Y, N, R, F, G, S и T; (c) X_3 выбирают из группы, состоящей из A, P, Q, S, F, H, N и R; (d) X_4 выбирают из группы, состоящей из G и A; (e) X_5 выбирают из группы, состоящей из H, L, R, V, N, D, F, I и K; (f) X_6 выбирают из группы, состоящей из A, L, G, M, F, I и V и (g) X_7 выбирают из группы, состоящей из H и N. Согласно некоторым вариантам осуществления X_1 представляет собой S, и/или X_2 представляет собой H или Y, и/или X_3 представляет собой A или P, и/или X_4 представляет собой G, и/или X_5 представляет собой H, L или R, и/или X_6 представляет собой A или L, и/или X_7 представляет собой H.

Согласно другим вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -A, где (a) X_{19} выбирают из группы, состоящей из D, E, V и W; (b) X_{20} выбирают из группы, состоящей из A, S и V; (c) X_{21} выбирают из группы, состоящей из R, A, G, K и L; и (d) X_{22} выбирают из группы, состоящей из L и R. Согласно некоторым вариантам осуществления X_{19} представляет собой D, и/или X_{20} представляет собой A, S или V, и/или X_{22} представляет собой L.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_8 , где X_8 представляет собой V или L.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{23} -G-R-G- X_{24} , причем (a) X_{23} выбирают из группы, состоящей из V, P, F, I и L; и (b) X_{24} выбирают из группы, состоящей из S, N и T.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG полипептида согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} , причем (a) X_9 выбирают из группы, состоящей из L, V и I; (b) X_{10} выбирают из группы, состоящей из T и S; (c) X_{11} выбирают из группы, состоящей из K, R, A, G, S, D, H, N, T и P; (d) X_{12} выбирают из группы, состоящей из S, T, A, E, H, K и N; (e) X_{13} выбирают из группы, состоящей из K, G, Q, D, E, N, T и S; (f) X_{14} выбирают из группы, состоящей из V, I, F, L, M, P, T и Y; (g) X_{15} выбирают из группы, состоящей из I, L и Y; (h) X_{16} выбирают из группы, состоящей из H, I, V, K, L, R, F, G, S и T; (i) X_{17} выбирают из группы, состоящей из Y и H; и (j) X_{18} выбирают из группы, состоящей из K, M, L, R и V.

Согласно некоторым вариантам осуществления X_9 представляет собой L или V, и/или X_{10} представляет собой T, X_{11} представляет собой K или R, и/или X_{12} представляет собой S или T, и/или X_{13} представляет собой K, G или Q, и/или X_{14} представляет собой V или I, и/или X_{15} представляет собой I, и/или X_{16} представляет собой H, I или V, и/или X_{17} представляет собой Y и/или X_{18} представляет собой K или M.

Согласно другим вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} , причем (a) X_{25} выбирают из группы, состоящей из I и V; (b) X_{26} выбирают из группы, состоящей из F, D и Y; (c) X_{27} выбирают из группы, состоящей из D и T; (d) X_{28} выбирают из группы, состоящей из P, M, V и T; (e) X_{29} выбирают из группы, состоящей из V, L, N, R и S; (f) X_{30} выбирают из группы, состоящей из H, T, L, N, Q и S; (g) X_{31} выбирают из группы, состоящей из F, W, Y, H и L; и (h) X_{32} выбирают из группы, состоящей из D, A и G.

Согласно некоторым вариантам осуществления X_{25} представляет собой I, и/или X_{26} представляет собой F, и/или X_{27} представляет собой D, и/или X_{28} представляет собой P, и/или X_{29} представляет собой V, и/или X_{30} представляет собой H или T, и/или X_{31} представляет собой F или W, и/или X_{32} представляет собой D.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю BC и петлю DE, или петлю BC и петлю FG, или петлю DE и петлю FG, или петлю BC, петлю DE и петлю FG.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC полипептида содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38. Согласно другим вариантам осуществления петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45. Согласно еще другим вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность петли BC, DE или FG по меньшей мере на 80% идентична любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно. Согласно другим вариантам осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273. Согласно еще другим вариантам осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды содержат комбинации петель BC, DE и FG, как показано в таблице 1. Согласно одному варианту осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} , причем X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля DE содержит одну аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_{40} , где X_{40} представляет собой L.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} , где X_{41} представляет собой L или I; X_{42} представляет собой S; X_{43} представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X_{44} представляет собой S, A, E, H, K или N; X_{45} представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X_{46} представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X_{47} представляет собой I или Y; X_{48} представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X_{49} представляет собой H и X_{50} представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как

консервативная аминокислотная замена. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $X_{33}\text{-L-P-X}_{34}\text{-X}_{35}\text{-X}_{36}\text{-X}_{37}\text{-X}_{38}\text{-X}_{39}$, где X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H, и петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $G\text{-R-G-X}_{40}$, где X_{40} представляет собой L.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $X_{33}\text{-L-P-X}_{34}\text{-X}_{35}\text{-X}_{36}\text{-X}_{37}\text{-X}_{38}\text{-X}_{39}$, где X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H, и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $X_{41}\text{-X}_{42}\text{-X}_{43}\text{-X}_{44}\text{-X}_{45}\text{-X}_{46}\text{-X}_{47}\text{-X}_{48}\text{-X}_{49}\text{-X}_{50}$, где X_{41} представляет собой L или I; X_{42} представляет собой S; X_{43} представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X_{44} представляет собой S, A, E, H, K или N; X_{45} представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X_{46} представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X_{47} представляет собой I или Y; X_{48} представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X_{49} представляет собой H и X_{50} представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $G\text{-R-G-X}_{40}$, где X_{40} представляет собой L, и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $X_{41}\text{-X}_{42}\text{-X}_{43}\text{-X}_{44}\text{-X}_{45}\text{-X}_{46}\text{-X}_{47}\text{-X}_{48}\text{-X}_{49}\text{-X}_{50}$, где X_{41} представляет собой L или I; X_{42}

представляет собой S; X₄₃ представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X₄₄ представляет собой S, A, E, H, K или N; X₄₅ представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X₄₆ представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X₄₇ представляет собой I или Y; X₄₈ представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X₄₉ представляет собой H и X₅₀ представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле X₃₃-L-P-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉, где X₃₃ представляет собой T или Y; X₃₄ представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X₃₅ представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X₃₆ представляет собой A; X₃₇ представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X₃₈ представляет собой L, G, M, F, I или V и X₃₉ представляет собой H; петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле G-R-G-X₄₀, где X₄₀ представляет собой L; и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄-X₄₅-X₄₆-X₄₇-X₄₈-X₄₉-X₅₀, где X₄₁ представляет собой L или I; X₄₂ представляет собой S; X₄₃ представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X₄₄ представляет собой S, A, E, H, K или N; X₄₅ представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X₄₆ представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X₄₇ представляет собой I или Y; X₄₈ представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X₄₉ представляет собой H и X₅₀ представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, и содержит аминокислотные замены в петлях BC, DE и FG, которые позволяют полипептиду поддерживать связывание с миостатином. Такие аминокислотные замены могут быть определены, например, глубоким мутационным сканированием, как описано в примере 8. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю BC, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₅₁-X₅₂-X₅₃-X₅₄-X₅₅-X₅₆-X₅₇-X₅₈-X₅₉, где X₅₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₂ выбирают из

группы, состоящей из L, M и V; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G и S; X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления X₅₁ выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из P; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G; X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X₅₁ выбирают из группы, состоящей из F, S и W; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из P; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G; X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, G, и L; и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из H, N и Q. Согласно конкретному варианту осуществления X₅₁ представляет собой S; X₅₂ представляет собой L; X₅₃ представляет собой P; X₅₄ представляет собой H; X₅₅ представляет собой Q; X₅₆ представляет собой G; X₅₇ представляет собой K; X₅₈ представляет собой A; X₅₉ представляет собой N.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю DE, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X₆₀, где X₆₀ представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V. Согласно предпочтительному варианту осуществления X₆₀ представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X₆₀ представляет собой C, E, I, L, M и V. Согласно конкретному варианту осуществления X₆₀ представляет собой B.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₆₁-

X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} , где X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y; X_{62} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{66} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{69} выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V, X_{62} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X_{66} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X_{61} выбирают из группы, состоящей из I и V; X_{62} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W; X_{66} выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W; X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R. Согласно конкретному варианту осуществления X_{61} представляет собой V; X_{62} представляет собой T; X_{63} представляет собой D; X_{64} представляет собой T; X_{65} представляет собой G; X_{66} представляет собой Y; X_{67} представляет собой L; X_{68} представляет собой K; X_{69} представляет собой Y и X_{70} представляет собой K.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где X_{51} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{52} выбирают из группы, состоящей из L, M и V; X_{53} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y; X_{54} представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{56} выбирают из группы, состоящей из G и S; X_{57} представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{58} представляет собой A, C, G, L, M, S и T; и X_{59} представляет собой A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G-R-G-X_{60}$, где X_{60} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y; X_{62} представляет собой A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{66} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{69} выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

Согласно предпочтительному варианту осуществления полипептид согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где X_{51} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y; X_{52} представляет собой L; X_{53} представляет собой P; X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{56} представляет собой G; X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y; X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и X_{59}

выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_{60} , где X_{60} выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M, Q, T и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} , где X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V; X_{62} представляет собой C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X_{66} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления полипептид согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} , где X_{51} выбирают из группы, состоящей из F, S и W; X_{52} представляет собой L; X_{53} представляет собой P; X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y; X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y; X_{56} представляет собой G; X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y; X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G и L; и X_{59} выбирают из группы, состоящей из H, N и Q; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_{60} , где X_{60} выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} , где X_{61} выбирают из группы, состоящей из I и V; X_{62} представляет собой C, F, I, L, M, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W; X_{66} выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W; X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

Согласно конкретному варианту осуществления полипептид согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где X_{51} представляет собой S; X_{52} представляет собой L; X_{53} представляет собой P; X_{54} представляет собой H; X_{55} представляет собой Q; X_{56} представляет собой G; X_{57} представляет собой K; X_{58} представляет собой A; X_{59} представляет собой N; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G-R-G-X_{60}$, где X_{60} представляет собой V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где X_{61} представляет собой V; X_{62} представляет собой T; X_{63} представляет собой D; X_{64} представляет собой T; X_{65} представляет собой G; X_{66} представляет собой Y; X_{67} представляет собой L; X_{68} представляет собой K; X_{69} представляет собой Y и X_{70} представляет собой K.

Согласно другому варианту осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 273 [PRD-1474], SEQ ID NO: 118 [3116_A06], SEQ ID NO: 281 [сердцевинная последовательность аднектина PRD-1474 и 3116_A06 с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL) и последующим C-концевым хвостом (EI)] или SEQ ID NO: 331 [сердцевинная последовательность аднектина PRD-1474 и 3116_A06 без N-концевой лидерной последовательности или C-концевого хвоста]. Согласно еще одному варианту осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную областям петель не-BC, DE и FG в SEQ ID NO: 118, 273, 281 или 331.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрены полипептиды, которые связываются с прерывающимся сайтом связывания аднектина на миостатине. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды связываются с областью в пределах аминокислот 55-66 миостатина (SEQ ID NO: 3). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды связываются с областью в пределах аминокислот 85-101 миостатина (SEQ ID NO: 3). Согласно другим вариантам осуществления полипептиды связывается в пределах двух областей, аминокислоты 85-101 и 55-66, миостатина (SEQ ID NO: 3).

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению не конкурируют за связывание с миостатином с ActRIIB. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению конкурируют за связывание с миостатином с ALK4 и/или ALK5.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные выше полипептиды могут содержать один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, такие как полиэтиленгликоль, сиаловая кислота, Fc, фрагмент Fc, трансферрин, сывороточный альбумин, связывающий сывороточный альбумин белок и связывающий сывороточный иммуноглобулин белок. Согласно одному варианту осуществления фрагмент ПК представляет собой связывающий сывороточный альбумин белок, который содержит домен $^{10}\text{Fn3}$, который связывается, например, с HSA. Согласно другому варианту осуществления фрагмент ПК представляет собой Fc и может находиться либо на N-, либо на C-конце полипептида, и необязательно образовывать димер. Согласно другим вариантам осуществления фрагмент ПК представляет собой полиэтиленгликоль. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент ПК и полипептид связаны с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи, пептидной связи, полипептида, сахара или полимерного полиэтиленгликолевого фрагмента.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая описанный выше полипептид, который необязательно свободен от эндотоксина.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая описанный выше полипептид, вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, и клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ получения антимиостатинового полипептида путем культивирования клетки.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта путем введения эффективного количества полипептида или содержащей описанный выше полипептид композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления подлежащее лечению заболевание представляет собой мышечную дистрофию, боковой амиотрофический склероз, миозит с включенными тельцами (IBM), застойное обструктивное заболевание легких, хроническую сердечную

недостаточность, злокачественную опухоль, СПИД, почечную недостаточность, хроническое заболевание почек, уремию, ревматоидный артрит, саркопению, атрофию мышц из-за длительного постельного режима, травму спинного мозга, инсульт, перелом костей, старение, диабет, ожирение, гипергликемию, кахексию, остеоартрит, остеопороз, инфаркт миокарда или фиброз.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ ослабления или ингибирования нарушения, связанного с дегенерацией или атрофией мышц у субъекта.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ введения полипептида для увеличения мышечной массы, увеличения количества мышечных клеток, увеличения размера мышечных клеток, увеличения мышечной силы, физической работоспособности и/или выносливости у субъекта.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ ослабления или ингибирования нарушение обмена веществ у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение обмена веществ представляет собой сахарный диабет (например, сахарный диабет типа II), гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию, резистентность к инсулину, нарушение метаболизма глюкозы, липодистрофию, ожирение или метаболический синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть введена вторая терапевтическая композиция. Согласно другим вариантам осуществления введение полипептида приводит к повышенной чувствительности к инсулину, повышенному поглощению глюкозы клетками, снижению уровня глюкозы в крови и/или снижению жира в организме.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения мышечной массы у субъекта, включающий введение эффективного количества описанного выше полипептида или композиции.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения соотношения сухой мышечной массы к жиру у субъекта, включающий введение эффективного количества описанного выше полипептида или композиции.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрены наборы, содержащие описанный выше полипептид или композицию и инструкции по применению.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрены способы обнаружения или измерения миостатина в образце, включающие контактирование

образца с описанным выше полипептидом и обнаружение или измерение связывания полипептида с миостатином.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к связывающимся с миостатином аднектинам для использования в ослаблении или ингибировании связанного с миостатином заболевания или нарушения, ослабления или ингибирования нарушения, связанного с дегенерацией или атрофией мышц, увеличения мышечной массы, увеличения числа мышечных клеток, увеличения размера мышечных клеток, увеличения мышечной силы, физической работоспособности и/или выносливости, ослабления или ингибирования нарушение обмена веществ, повышения сухой мышечной массы и/или увеличения соотношения сухой мышечной массы к жиру у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины представляют собой описанные в настоящем документе, например, антимиостатиновые аднектины, представленные в SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению связывающих антимиостатиновых аднектинов для получения лекарственного средства для ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения, ослабления или ингибирования нарушения, связанного с дегенерацией или атрофией мышц, увеличения мышечной массы, увеличения количества мышечных клеток, увеличения размера мышечных клеток, увеличения мышечной силы, физической работоспособности и/или выносливости, ослабления или ингибирования нарушения обмена веществ, повышения сухой мышечной массы и/или увеличения соотношения сухой мышечной массы к жиру у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины представляют собой описанные в настоящем документе, например, антимиостатиновые аднектины, представленные в SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273.

Краткое описание графических материалов

На фигуре 1 показано выравнивание иллюстративных аминокислотных последовательностей антимиостатинового аднектина. Аминокислотные последовательности петель BC, DE и FG идентифицируют с помощью подчеркивания, курсива/подчеркивания или жирного шрифта/подчеркивания, соответственно.

На фигуре 2 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли BC семейства 1979_B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в

каждом положении петли BC, которые изменялись во время PROfusion. Изображение было создано с использованием WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004;14:1188-1190).

На фигуре 3 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли DE семейства 1979_B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли DE, которые изменялись во время PROfusion.

На фигуре 4 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли FG семейства 1979_B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли FG, которые изменялись во время PROfusion.

На фигуре 5 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли BC семейства 2062_G02 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли BC, которые изменялись во время PROfusion.

На фигуре 6 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли DE семейства 2062_G02 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли DE, которые изменялись во время PROfusion.

На фигуре 7 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли FG семейства 2062_G02 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли FG, которые изменялись во время PROfusion.

На фигуре 8 изображен график, показывающий корреляцию биохимических и основанных на клетках данных для дискретных аланиновых мутантных белков аднектина 3116_A06 с их относительной пригодностью в глубоком мутационном сканировании в соответствии с положением последовательности.

На фигуре 9 изображен график, показывающий корреляцию ER^{norm} от глубокого мутационного сканирования NGS аланиновых мутаций аднектина 3116_A06 с IC50, измеренной с помощью HTRF. Указаны расстояния между двумя основаниями для предпочтительных, более предпочтительных и наиболее предпочтительных мутаций в одном сайте для связывания с миостатином.

На фигуре 10 изображен график анализа конкурентного связывания (конкурентный анализ ELISA), показывающий, что аднектины PRD-1285, PRD-1286 и PRD-1288 не блокируют связывание миостатина с ActRIIb-Fc. Указан % конкуренции связывания ActRIIb-Fc с миостатином. Как и ожидалось, положительный контроль-конструкт ActRIIb-Fc конкурировал за связывание ActRIIb-Fc с миостатином.

На фигуре 11 изображен график, показывающий влияние различных концентраций аднектинов PRD-1285, PRD-1286 и PRD-1288 на миостатиновую активность в ARE-

люциферазном анализе. Экспериментальные условия описаны в примере 3. Каждый из PRD-1285, PRD-1286 и PRD-1288 ингибировал на 100% индуцированную миостатином ARE-люциферазную активность.

Фигура 12 представляет собой схематическое изображение механизма действия, с помощью которого аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют активность миостатина. Нативный сигнальный комплекс показан на фиг. 12А. В частности, после связывания миостатина с ActRIIb следует вовлечение активин рецептороподобной киназы 4 (ALK4) или ALK5, и ActRIIb и ALK4/5 связываются с различными областями миостатина. Аднектины согласно настоящему изобретению предотвращают связывание ALK4/5, но не ActRIIb, с миостатином (фиг. 12В).

На фигуре 13 показана расчетная модель, изображающая комплекс 3116_A06 и миостатина. На фиг. 13А показана структура одного миостатина (серый) с указанными сайтами связывания ALK4 и сайтами связывания ActRIIb. Области, где 3116_A06 связывается с миостатином (т.е. области 1 и 2), показаны черным, что определено из описанных в примере 11 экспериментов. На фиг. 13В представлен предпочтительный комплекс 3116_A06 (черный) и миостатина (серый), полученный из стыковочного протокола, как описано в примере 12. Области миостатина 1 и 2, определенные с помощью HDX-MS (пример 11), представлены в виде заполненного пространства на одной стороне одной молекулы, а петли BC, DE и FG 3116_A06 представлены в стержневой визуализации. Хотя эта фигура показывает один аднектин, связанный с одним из двух сайтов связывания аднектина, следует отметить, что может быть занят либо отдельный сайт связывания аднектина, либо оба сайта связывания аднектина.

На фигуре 14 изображена диаграмма, показывающая процент увеличения массы тела на 15 день у мышей, получавших указанные антимиостатиновые аднектины, в сравнении с контрольными мышами. Мышам B6 SCID вводили либо раз в две недели, либо еженедельно подкожные инъекции антимиостатиновых аднектинов в течение 14 дней, как описано в примере 13. Измеряли массу тела на протяжении всего периода лечения; изображены расчетные значения процентных изменений на 15 день. (*= указывает на статистические отличия от соответствующей контрольной группы, $p \leq 0,01$ *t-критерий*).

На фигуре 15 изображена диаграмма, показывающая увеличение объема мышц ног (в см³) на 15 день у мышей, получавших указанные антимиостатиновые аднектины, в сравнении с контрольными мышами. Мышам B6 SCID вводили либо раз в две недели,

либо еженедельно подкожные инъекции антимиостатиновых аднектинов в течение 14 дней, как описано в примере 13. (*= указывает на статистические отличия от соответствующей контрольной группы, $p \leq 0,01$ *t*-критерий).

На фигуре 16 изображена диаграмма, показывающая увеличение объема мышц ног (в см³) на 28 день у мышей, получавших различные указанные дозы PRD-1474. Мышам B6 SCID вводили либо раз в две недели, либо еженедельно подкожные инъекции PRD-1474 в течение 28 дней, как описано в примере 14 (* $p < 0,0001$; # не достоверно между группами).

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины характеризуются тем же значением, что и обычно понимаемое специалистом в настоящей области техники. Хотя любые способы и композиции, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы в практике или при исследовании настоящего изобретения, предпочтительные способы и композиции описаны в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "полноразмерный миостатин" относится к полноразмерной полипептидной последовательности, описанной в McPherron et al. (1997), *выше*, а также родственным полноразмерным полипептидам, включающим в себя аллельные варианты и межвидовые гомологи. Термин "миостатин" или "зрелый миостатин" относится к фрагментам биологически активного зрелого миостатина, а также родственным полипептидам, включающим в себя аллельные варианты, варианты сплайсинга и слитые пептиды и полипептиды. Сообщалось, что зрелый С-концевой белок характеризуется 100% идентичностью последовательности среди многих видов, включающих в себя человека, мышь, курицу, свинью, индейку и крысу (Lee et al., *PNAS* 2001;98:9306). Последовательность человеческого препромиостатина представляет собой:

MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAI
KIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT
TETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVK AQLWIYLRPVETPTTVFV
QILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNW LKQPESNLGIEIK
ALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRY

PLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCC
TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 1)

Последовательность человеческого про-миостатина представляет собой:

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLL
PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCC
FFKFSSKIQYNKVVK AQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGRYTGIRSLKLD
MNPGTGIWQSIDVKT VLNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNP
FLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKAN
YCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCC TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKI
PAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 2)

Последовательность зрелого миостатина (сохраненная у человека, мыши, крысы, куры, индейки, собаки, лошади и свиньи) представляет собой:

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYP
HTHLVHQANPRGSAGPCC TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ
ID NO: 3).

Используемый в настоящем документе термин "полипептид" относится к любой последовательности из двух или более аминокислот, независимо от длины, посттрансляционной модификации или функции. "Полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Полипептиды могут включать в себя природные аминокислоты и неприродные аминокислоты, такие как те, которые описаны в патенте США № 6559126, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Полипептиды также могут быть модифицированы любым из различных стандартных химических способов (например, аминокислота может быть модифицирована защитной группой; карбокси-концевая аминокислота может быть получена в концевой амидной группе; амино-концевой остаток может быть модифицирован группами для, например, повышения липофильности, или полипептид может быть химически гликозилирован или иным образом модифицирован для повышения стабильности или периода полураспада *in vivo*). Модификации полипептида могут включать в себя прикрепление другой структуры, такой как циклическое соединение, или другой молекулы к полипептиду, а также могут включать в себя полипептиды, которые содержат одну или несколько аминокислот в измененной конфигурации (т.е., R или S, или L или D). Пептиды согласно настоящему изобретению представляют собой белки, полученные из десятого домена фибронектина типа III, которые были модифицированы, чтобы

связываться с миостатином, и обозначаются в настоящем документе как "антимиостатиновый аднектин" или "миостатиновый аднектин".

Используемый в настоящем документе термин "полипептидная цепь" относится к полипептиду, в котором каждый из его доменов присоединен к другому домену(ам) пептидной связью(ями), в отличие от нековалентных взаимодействий или дисульфидных связей.

"Выделенный" полипептид представляет собой тот, который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой вещества, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим применениям полипептида и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно предпочтительным вариантам осуществления полипептид будет очищен (1) до более чем 95% по массе полипептида, как определено по способу Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания Кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Выделенный полипептид включает в себя полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент природной среды полипептида не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид будет подготовлен по меньшей мере путем одной стадии очистки.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в настоящем документе определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в настоящей области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого программного обеспечения, как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR™). Специалисты в настоящей области техники

могут легко определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая в себя любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А по сравнению с или по отношению к данной последовательности В (которая альтернативно может быть сформулирована как данная аминокислотная последовательность А, которая содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом: 100 кратная фракция X/Y , где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании этой программой А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Следует иметь в виду, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная замена" обозначает замену аминокислотного остатка другим без изменения общей конформации и функции пептида, включая в себя без ограничения замещение аминокислоты аминокислотой, характеризующейся аналогичными свойствами (такими как, например, полярность, потенциал водородных связей, кислотность, основность, форма, гидрофобность, ароматичность и т.п.). Аминокислоты с аналогичными свойствами хорошо известны в настоящей области техники. Например, аргинин, гистидин и лизин представляют собой гидрофильно-основные аминокислоты и могут быть взаимозаменяемыми. Аналогичным образом, изолейцин, гидрофобная аминокислота, может быть заменен лейцином, метионином или валином. Нейтральные гидрофильные аминокислоты, которые могут быть заменены друг другом, включают в себя аспарагин, глутамин, серин и треонин. Под "замененными" или "модифицированными" настоящее изобретение включает в себя те аминокислоты, которые были изменены или модифицированы из встречающихся в природе аминокислот. Таким образом, следует понимать, что в контексте настоящего изобретения консервативная замена признается в настоящей области техники как

замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая характеризуется аналогичными свойствами.

Используемый в настоящем документе термин "связывающий аднектин сайт" относится к сайту или части белка (например, миостатина), который взаимодействует или связывается с конкретным аднектином (например, в качестве эпитопа распознается антителом). Связывающие аднектин сайты могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, расположенных рядом в третичной структуре белка. Связывающие аднектин сайты, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, тогда как связывающие аднектин сайты, образованные третичной структурой, как правило, теряются при воздействии денатурирующими растворителями.

Связывающий аднектин сайт для антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению может быть определен путем применения стандартных техник, обычно используемых для картирования эпитопов антител, включающих в себя без ограничения протеазное картирование и мутационный анализ. Альтернативно, связывающий аднектин сайт может быть определен путем конкурентного анализа с использованием эталонного аднектина или антитела, которое связывается с тем же полипептидом, например, миостатином (как дополнительно описано ниже в разделе "Перекрестно конкурирующие аднектины и/или аднектины, которые связываются с тем же связывающим аднектин сайтом". Если исследуемый аднектин и эталонная молекула (например, другой аднектин или антитело) конкурируют, тогда они связываются с тем же связывающим аднектин сайтом или связывающими аднектин сайтами достаточно близко, чтобы связывание одной молекулы мешало другой.

Термины "специфически связывается", "специфическое связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к аднектину, который проявляет аффинность к миостатину, но существенно не связывается (например, менее чем приблизительно 10 % связывания) с другим полипептидом, что измерено с помощью техники, доступной в настоящей области техники, такой как, без ограничения, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например, конкурентный анализ ELISA, анализ BIACORE). Этот термин также применим, когда, например, связывающий домен

аднектина согласно настоящему изобретению представляет собой специфический для миостатина.

Используемый в настоящем документе термин "преимущественно связывается" относится к ситуации, в которой аднектин согласно настоящему изобретению связывается с миостатином по меньшей мере приблизительно на 20% больше, чем он связывается с другим полипептидом, что измерено с помощью техники, доступной в настоящей области техники, такой как, без ограничения, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например, конкурентный анализ ELISA, анализ BIACORE).

Используемый в настоящем документе термин "перекрестная реактивность" относится к аднектину, который связывается более чем с одним отдельным белком, содержащим идентичные или очень похожие сайты связывания аднектина.

Используемый в настоящем документе термин " K_D " предназначен для обозначения константы равновесия диссоциации конкретного взаимодействия аднектин-белок (например, миостатин) или аффинности аднектина к белку (например, миостатину), как измерено с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания клеток. Используемый в настоящем документе термин "желательная K_D " относится к K_D аднектина, которая достаточна для предусмотренных целей. Например, желательная K_D может относиться к K_D аднектина, необходимой, чтобы вызвать функциональный эффект в анализе *in vitro*, например, основанном на клетках люциферазного анализа.

Используемый в настоящем документе термин " k_{ass} " предназначен для обозначения константы скорости ассоциации для ассоциации аднектина в комплекс аднектин/белок.

Используемый в настоящем документе термин " k_{diss} " предназначен для обозначения константы скорости диссоциации для диссоциации аднектина из комплекса аднектин/белок.

Используемый в настоящем документе термин " IC_{50} " относится к концентрации аднектина, которая ингибирует реакцию, как *in vitro*, так и в анализе *in vivo*, до уровня, который составляет 50% от максимальной ингибирующей реакции, т.е., посередине между максимальной ингибирующей реакцией и реакцией без воздействия.

Используемый в настоящем документе термин "миостатиновая активность" относится к одной или нескольким регулирующим рост или морфогенетическим активностям,

связанным со связыванием активного белка миостатина с ActRIIb и последующим вовлечением Alk4 или Alk5. Например, активный миостатин представляет собой негативный регулятор массы скелетных мышц. Активный миостатин также может модулировать продукцию специфических для мышц ферментов (например, креатинкиназы), стимулировать пролиферацию миобластов и модулировать дифференцировку преадипоцитов в адипоциты. Миостатиновая активность может быть определена с использованием известных в настоящей области способов, таких как те, которые описаны в настоящем документе.

Фразы "ингибировать активность миостатина" или "противодействовать активности миостатина" или "противодействовать миостатину" используются взаимозаменяемо для обозначения способности антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению нейтрализовать или противодействовать активности миостатина *in vivo* или *in vitro*. Используемые в настоящем документе по отношению к активности аднектина согласно настоящему изобретению термины "ингибировать" или "нейтрализовать" означают способность существенно противодействовать, препятствовать, предотвращать, сдерживать, замедлять, нарушать, устранять, останавливать, сокращать или отменять, например, прогрессирование или тяжесть того, что ингибируется, включая в себя без ограничения биологическую активность или свойство, заболевание или состояние. Ингибирование или нейтрализация составляет предпочтительно по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или выше.

Например, антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению может снижать циркулирующие уровни биологически активного миостатина, обычно находящегося у позвоночного субъекта, или снижать циркулирующие уровни биологически активного миостатина у субъектов с нарушениями, которые приводят к повышенным циркулирующим уровням миостатина. Снижение активности миостатина может быть определено с использованием анализов *in vitro*, например, анализов связывания, как описано в настоящем документе. Альтернативно, снижение активности миостатина может приводить к увеличению массы тела, повышению мышечной массы, увеличению мышечной силы, изменению соотношения мышц к жиру, увеличению безжировой мышечной массы, увеличению размера и/или количеству мышечных клеток и/или снижению содержания жира в организме.

Термин "РК" представляет собой аббревиатуру "фармакокинетические" и охватывает свойства соединения, включающие в себя, в качестве примера, абсорбцию,

распределение, метаболизм и элиминацию субъектом. Используемый в настоящем документе термин "белок РК модуляции" или "РК фрагмент" относится к любому белку, пептиду или фрагменту, который влияет на фармакокинетические свойства биологически активной молекулы при слиянии или введении вместе с биологически активной молекулой. Примеры белка РК модуляции или РК фрагмента включают в себя ПЭГ, связывающие человеческий сывороточный альбумин (HSA) (как описано в публикации США № 2005/0287153 и 2007/0003549, публикации РСТ № WO 2009/083804 и WO 2009/133208), человеческий сывороточный альбумин, Fc или Fc-фрагменты и их варианты, а также сахара (например, сиаловую кислоту).

"Период полураспада" аминокислотной последовательности или соединения в общем случае может быть определен как время, необходимое для сывороточной концентрации полипептида для уменьшения на 50%, *in vivo*, например, из-за деградации последовательности или соединения и/или клиренса или секвестрации последовательности или соединения природными механизмами. Период полураспада можно определить любым способом, известным *per se*, например, путем фармакокинетического анализа. Подходящие техники будут понятны специалисту в настоящей области техники и могут, например, как правило, включать в себя стадии соответствующего введения субъекту подходящей дозы аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению; сбор образцов крови или других образцов от субъекта через постоянные промежутки времени; определение содержания или концентрации аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению в указанном образце крови; и вычисление из (кривой зависимости) полученных таким образом данных, времени, пока содержание или концентрация аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению было уменьшено на 50%, по сравнению с исходным содержанием при дозировании. Эталон получают, например, по стандартным справочникам, таким как Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Reference is also made to Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Период полураспада может быть выражен с использованием таких параметров, как $t_{1/2}$ -альфа, $t_{1/2}$ -бета, HL_Lambda_z и площадь под кривой (AUC). В настоящем описании "увеличение периода полураспада" относится к увеличению любого одного из этих параметров, любых двух из этих параметров, любых трех из этих параметров

или всех этих четырех параметров. "Увеличение периода полураспада", в частности, относится к увеличению $t_{1/2}$ -бета и/или HL_Lambda_z , с или без увеличения $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или того и другого.

Обозначения "mрк", "мг/кг" или "мг на кг" относится к миллиграммам на килограмм.

Все обозначения в настоящем раскрытии используются взаимозаменяемо.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к животному, предпочтительно видам млекопитающих (в том числе неprimатам и приматам) или птиц, включая в себя без ограничения мышевидных, обезьян, людей, сельскохозяйственных млекопитающих животных (например, крупный рогатый скот, свиней, овец), млекопитающих-спортивных животных (например, лошадей) и млекопитающих-домашних животных (например, собак и кошек); предпочтительно термин относится к людям. Термин также относится к видам птиц, включающим в себя без ограничения кур и индеек. Согласно определенному варианту осуществления субъект, предпочтительно млекопитающее, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется наличием заболевания или нарушения, или состояния, для которого было бы полезно снижение содержания или уменьшение биологической активности миостатина. Согласно другому варианту осуществления субъект, предпочтительно млекопитающее, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется риском развития нарушения, заболевания или состояния, для которого было бы полезно снижение содержания или уменьшение биологической активности миостатина.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится по меньшей мере к минимальной дозе, но меньшей, чем токсическая доза, средства, которое необходимо субъекту для получения терапевтической пользы. Например, терапевтически эффективное количество антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, приводит к одному или нескольким из следующего: увеличению объема мышц и/или мышечной силы, снижению жира тела, увеличению чувствительности к инсулину или лечению состояний, при которых присутствие миостатина вызывает или способствует нежелательному патологическому эффекту или снижение уровня миостатина приводит к полезному терапевтическому эффекту.

Используемый в настоящем документе термин "ослабленный" или "слабость" относится к состоянию, которое может быть охарактеризовано двумя или более симптомами из-за слабости, потери веса, замедленной подвижности, усталости,

низкого уровня активности, плохой выносливости и нарушения поведенческой реакции на сенсорные сигналы. Один признак слабости представляет собой "саркопению" или возрастную потерю мышечной массы.

Используемый в настоящем документе термин "кахексия" относится к состоянию ускоренной мышечной атрофии и потери сухой мышечной массы тела, которое может возникнуть в результате различных заболеваний.

Обзор

В настоящем изобретении предусмотрены новые полипептиды, которые связываются и противодействуют миостатину (далее именуемые как "антимииостатиновые аднектины"). Для того, чтобы идентифицировать антагонистов миостатина, миостатин был представлен большим синтетическим библиотекам аднектинов. Аднектины, которые связывались с миостатином, подвергались скринингу на связывание миостатина, биофизические свойства, а также на ингибиторную активность миостатина. Антимииостатиновые аднектины мутировали и подвергали дополнительному селективному давлению путем снижения концентрации мишени и выбора антимииостатиновых аднектинов с медленными скоростями диссоциации. Из этого процесса оптимизации семейство аднектинов идентифицировали как специфических ингибиторов миостатина с благоприятной биохимической и биофизической активностью. Раскрытые в настоящей заявке антимииостатиновые аднектины полезны для лечения нарушений, заболеваний и состояний, при которых известно, что ингибирование активности миостатина полезно, включая в себя без ограничения лечение связанных с атрофией мышц заболеваний, метаболических нарушений и мышечной атрофии из-за бездеятельности.

Как описано в Rebbapragada et al. (*MCB* 2003;23:7230-42), миостатиновый сигнальный путь включает в себя связывание миостатина с ActRIIb с последующим вовлечением активин-рецептороподобной киназы 4 (ALK4) или ALK5. Связывание с ALK индуцирует фосфорилирование Smad2/SMAD3 с последующей активацией подобного TGF β сигнального пути (смотрите, например, Rebbapragada et al., *MCB* 2003;23:7230-42).

I. Основанные на фибронектине каркасные элементы

Согласно одному аспекту настоящей заявки предусмотрены антимииостатиновые аднектины, содержащие домен Fn3, в котором одна или несколько доступных для растворителей петель была рандомизирована или мутирована. Согласно некоторым

вариантам осуществления домен Fn3 представляет собой домен Fn3, происходящий от десятого модуля дикого типа домена человеческого фибронектина типа III ($^{10}\text{Fn3}$):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 4) (петли BC, DE и FG подчеркнуты).

Согласно другим вариантам осуществления нелигандные связывающие последовательности $^{10}\text{Fn3}$, т.е. "каркасный элемент $^{10}\text{Fn3}$ ", могут быть изменены при условии, что $^{10}\text{Fn3}$ сохраняет функцию связывания лиганда и/или структурную стабильность. Сообщалось о разнообразии мутантных каркасных элементов $^{10}\text{Fn3}$. Согласно одному аспекту одна или несколько из Asp 7, Glu 9 и Asp 23 замещается другой аминокислотой, такой как, например, неотрицательно заряженный аминокислотный остаток (например, Asn, Lys и т.д.). Сообщалось, что эти мутации характеризуются эффектом обеспечения большей стабильности мутантного $^{10}\text{Fn3}$ при нейтральном pH, по сравнению с формой дикого типа (смотрите, например, публикации PCT № WO 02/04523). Был раскрыт ряд дополнительных изменений в каркасном элементе $^{10}\text{Fn3}$, которые либо полезны, либо нейтральны. Смотрите, например, Batori et al., *Protein Eng.*, 15(12):1015-1020 (December 2002); Koide et al., *Biochemistry*, 40(34):10326-10333 (Aug. 28, 2001).

Как варианты, так и дикого типа белки $^{10}\text{Fn3}$ характеризуются одинаковой структурой, а именно семь последовательностей доменов из бета-цепей, обозначенных от A до G, и шесть областей-петель (петля AB, петля BC, петля CD, петля DE, петля EF и петля FG), которые соединяют семь последовательностей доменов из бета-цепей. Бета-цепи, расположенные ближе всего к N- и C-концам, могут принимать бета-подобную конформацию в растворе. В SEQ ID NO: 4 петля AB соответствует остаткам 15-16, петля BC соответствует остаткам 21-30, петля CD соответствует остаткам 39-45, петля DE соответствует остаткам 51-56, петля EF соответствует остаткам 60-66 и петля EF соответствует остаткам 76-87 (Xu et al., *Chemistry & Biology*, 9:933-942, 2002).

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин представляет собой полипептид $^{10}\text{Fn3}$, который по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% идентичен человеческому домену $^{10}\text{Fn3}$, представленному в SEQ ID NO: 4. Большая часть изменчивости, как правило, происходит в одной или нескольких петлях. Каждая из бета или бета-подобных цепей полипептида $^{10}\text{Fn3}$ может состоять по существу из аминокислотной

последовательности, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности соответствующей бета или бета-подобной цепи SEQ ID NO: 4, при условии, что такое изменение не нарушает стабильность полипептида в физиологических условиях.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимиостатиновый аднектин, содержащий десятый домен фибронектина типа III ($^{10}\text{Fn3}$), причем домен $^{10}\text{Fn3}$ содержит петлю AB; петлю BC; петлю CD; петлю DE; петлю EF и петлю FG; и содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG с измененной аминокислотной последовательностью относительно последовательности соответствующей петли человеческого домена $^{10}\text{Fn3}$. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению содержат домен $^{10}\text{Fn3}$, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную областям непетли SEQ ID NO: 4, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, изменена. Согласно некоторым вариантам осуществления петли BC и FG изменены, и согласно некоторым вариантам осуществления петли BC, DE и FG изменены, т.е., домены $^{10}\text{Fn3}$ содержат не встречающиеся в природе петли. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены петли AB, CD и/или EF. Под "изменены" подразумевают одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по отношению к последовательности шаблона (соответствующему домену фибронектина человека) и включает в себя аминокислотные добавки, делеции, замены или их комбинации. Изменение аминокислотной последовательности может быть достигнуто путем преднамеренного, слепого или спонтанного изменения последовательности, как правило, последовательности кодирующей нуклеиновой кислоты, и может происходить любым способом, например, ПЦР, подверженной ошибкам ПЦР или химического синтеза ДНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько петель, выбранные из BC, DE и FG, может быть продлена или сокращена по длине по отношению к соответствующей петле фибронектина человека. Согласно некоторым вариантам осуществления длина петли может быть продлена на 2-25 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления длина петли может быть уменьшена посредством 1-11 аминокислот. Для оптимизации связывания антигена, следовательно, длина петли $^{10}\text{Fn3}$ может быть изменена в длину, а также в

последовательности, чтобы получить максимально возможную гибкость и сродство в связывании антигена.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит домен Fn3, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную областям без петель SEQ ID NO: 4, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, изменяется. Согласно некоторым вариантам осуществления измененная петля BC содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления измененная петля DE содержит до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислотных вставок или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислотных делеций, 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 комбинации.

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению основаны на каркасном элементе ¹⁰F_n3 и определяются, как правило, следующей последовательностью:

EVVAAT(Z)_aSLLI(Z)_xYYRITYGE(Z)_bQEFTV(Z)_yATI(Z)_cDYTITVYAV(Z)_zISINYRT
(SEQ ID NO: 5),

где петля AB представлена с помощью (Z)_a, петля CD представлена с помощью (Z)_b, петля EF представлена с помощью (Z)_c, петля BC представлена с помощью (Z)_x, петля DE представлена с помощью (Z)_y и петля FG представлена с помощью (Z)_z. Z представляет собой любую аминокислоту, а индекс после Z представляет собой целое число количества аминокислот. В частности, a может составлять приблизительно от 1 до 15, от 2 до 15, от 1 до 10, от 2 до 10, от 1 до 8, от 2 до 8, от 1 до 5, от 2 до 5, от 1 до 4, от 2 до 4, от 1 до 3, от 2 до 3 или от 1 до 2 аминокислот; и b, c, x, y и z каждый независимо может составлять от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 8, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 5 до 8, от 6 до 20, от 6 до 15, от 6 до 10, от 6 до 8, от 2 до 7, от 5 до 7 или от 6 до 7 аминокислот. Согласно предпочтительным вариантам осуществления a составляет 2 аминокислоты, b составляет 7 аминокислот, c составляет 7 аминокислот, x составляет 11 аминокислот, y составляет 6 аминокислот и z составляет 12 аминокислот. Последовательности бета цепей могут содержать в

пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замен, делеций или добавлений по всем 7 каркасным областям относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности бета-цепей могут содержать в пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 консервативных замен во всех 7 каркасных областях относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные остатки сердцевины фиксированы и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят в остатках, отличных от аминокислотных остатков сердцевины.

Альтернативно, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению основаны на каркасном элементе $^{10}\text{Fn3}$ и определяются, как правило, с помощью последовательности:

EVVAATPTSLI(Z)_xYYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)_yATISGLKPGVDYTITVYAV(Z)_zISINYRT (SEQ ID NO: 6)

где петля BC представлена с помощью (Z)_x, петля DE представлена с помощью (Z)_y и петля FG представлена с помощью (Z)_z. Z представляет собой любую аминокислоту, а индекс после Z представляет собой целое число количества аминокислот. В частности, x, y и z каждый независимо может составлять от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 8, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 5 до 8, от 6 до 20, от 6 до 15, от 6 до 10, от 6 до 8, от 2 до 7, от 5 до 7 или от 6 до 7 аминокислот. Согласно предпочтительным вариантам осуществления x составляет 11 аминокислот, y составляет 6 аминокислот и z составляет 12 аминокислот. Последовательности бета цепей могут содержать в пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замен, делеций или добавлений по всем 7 каркасным областям относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности бета цепей могут содержать в пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 консервативных замен во всех 7 каркасных областях относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные остатки сердцевины фиксированы и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят в остатках, отличных от аминокислотных остатков сердцевины.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе антимиостатиновый аднектин может содержать последовательность, как представлена в SEQ ID NO: 5 или 6, причем по меньшей мере одна из петель BC, DE и FG, как представлено с помощью $(Z)_x$, $(Z)_y$ и $(Z)_z$, соответственно, изменяется. Как описано выше, аминокислотные остатки, соответствующие остаткам 21-30, 51-56 и 76-87 SEQ ID NO: 4, определяют петли BC, DE и FG, соответственно. Тем не менее, следует понимать, что не каждый остаток в области петли должен быть изменен с тем, чтобы достичь связующего $^{10}\text{Fn3}$, характеризующегося сильной аффинностью к желаемой мишени (например, миостатину).

Например, остатки 21 (S) и 22 (W) петли BC, как показано в SEQ ID NO: 1, не нуждаются в модификации для связывания с миостатином. Т.е., домены $^{10}\text{Fn3}$ с высокой аффинностью связывания с миостатином могут быть получены путем модификации только остатков 23-30 петли BC, как показано в SEQ ID NO: 4. Это показано в петлях BC, примеры которых приведены в таблице 1, которые указывают на то, что только подчеркнутые положения модифицированы.

Подобным образом, положения 51 (P) и 56 (T) петли DE, как показано в SEQ ID NO: 4, не нуждаются в модификации для связывания с миостатином. Т.е., домены $^{10}\text{Fn3}$ с высокой аффинностью связывания с миостатином могут быть получены путем модификации только остатков 52-55 петли DE, как показано в SEQ ID NO: 4. Это показано в петлях DE, примеры которых приведены в таблице 1, которые указывают на то, что только остатки, охватывающих подчеркнутые положения, были изменены.

Кроме того, положения 76 (T) и 87 (P) петли FG, как показано в SEQ ID NO: 1, не нуждаются в модификации для связывания с миостатином. Т.е., домены $^{10}\text{Fn3}$ с высокой аффинностью связывания с миостатином могут быть получены путем модификации только остатков 77-86 петли FG, как показано в SEQ ID NO: 4. Это показано в петлях FG, примеры которых приведены в таблице 1, которые указывают на то, что только остатки, охватывающих подчеркнутые положения, были изменены.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления области петель BC, DE и FG антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению могут быть описаны в соответствии с консенсусными последовательностями. Эти консенсусные последовательности проиллюстрированы с помощью петель BC, DE и FG, показанных в таблице 1, и согласно анализу WebLogo (фиг. 2-7). (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004;14:1188-1190, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Анализ WebLogo создает аминокислотную сигнатуру, отражающую частоту аминокислот в каждом измененном положении петли BC, DE или FG.

Например, согласно некоторым вариантам осуществления петля BC, $(Z)_x$, определяется консенсусной последовательностью $X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$, где X_1 представляет собой S, T или Y; X_2 представляет собой H, Y, N, R, F, G, S или T; X_3 представляет собой A, P, Q, S, F, H, N или R; X_4 представляет собой G или A; X_5 представляет собой H, L, R, V, N, D, F, I или K; X_6 представляет собой A, L, G, M, F, I или V и X_7 представляет собой H или N. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38. Согласно одному варианту осуществления петля BC содержит аминокислоту, представленную в SEQ ID NO. 34.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE, $(Z)_y$, определяется консенсусной последовательностью $G-R-G-X_8$, где X_8 представляет собой V или L. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля DE содержит аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42. Согласно одному варианту осуществления петля DE содержит аминокислоту, представленную в SEQ ID NO. 39.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG, $(Z)_z$, определяется консенсусной последовательностью $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$, где X_9 представляет собой L, V или I; X_{10} представляет собой T или S; X_{11} представляет собой K, R, A, G, S, D, H, N, T или P; X_{12} представляет собой S, T, A, E, H, K или N; X_{13} представляет собой K, G, B, D, E, N, T или S; X_{14} представляет собой V, I, F, L, M, P, T или Y; X_{15} представляет собой I, L или Y; X_{16} представляет собой H, I, V, K, L, R, F, G, S или T; X_{17} представляет собой Y или H и X_{18} представляет собой K, M, L, R или V. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петля FG содержит аминокислоту, представленную в SEQ ID NO. 75.

Согласно другим вариантам осуществления петля BC, $(Z)_x$, определяется консенсусной последовательностью $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$, где X_{19} представляет собой D, E, V или W; X_{20} представляет собой A, S или V; X_{21} представляет собой R, A, G, K или L и X_{22} представляет собой L или R. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35.

Согласно другим вариантам осуществления петля DE, $(Z)_y$, определяется консенсусной последовательностью X_{23} -G-R-G- X_{24} , где X_{23} представляет собой V, P, F, I или L и X_{24} представляет собой S, N или T. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45.

Согласно другим вариантам осуществления петля FG, $(Z)_z$, определяется консенсусной последовательностью X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} , где X_{25} представляет собой I или V; X_{26} представляет собой F, D или Y; X_{27} представляет собой D или T; X_{28} представляет собой P, M, V или T; X_{29} представляет собой V, L, N, R или S; X_{30} представляет собой H, T, L, N, Q или S; X_{31} представляет собой F, W, Y, H или L и X_{32} представляет собой D, A или G. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимиостатиновый аднектин, содержащий петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 , и петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность G-R-G- X_8 , как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38, и петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42. Согласно одному варианту осуществления петли BC и DE содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 39, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 , и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} , как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петли BC и FG содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 75, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность G-R-G- X_8 , и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} , как

определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петли DE и FG содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39 и 75, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность $X_1-L-P-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$, петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность $G-R-G-X_8$ и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$, как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38, петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петли BC, DE и FG содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно.

Согласно другим вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимиостатиновый аднектин, содержащий петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$, и петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность $X_{23}-G-R-G-X_{24}$, как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35, и петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45.

Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$ и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}$, как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.

Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность $X_{23}-G-R-G-X_{24}$ и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{30}-X_{32}$, как определено

выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.

Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю BC, $(Z)_x$, содержащую последовательность $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$, содержит петлю DE, $(Z)_y$, содержащую последовательность $X_{23}-G-R-G-X_{24}$, и петлю FG, $(Z)_z$, содержащую последовательность $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}$, как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35, петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 6, причем петли BC, DE и FG, как представлено $(Z)_x$, $(Z)_y$, и $(Z)_z$, соответственно, заменены соответствующим набором петель BC, DE и FG, содержащих консенсусные последовательности SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно.

Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 6, причем петли BC, DE и FG, как представлено $(Z)_x$, $(Z)_y$, и $(Z)_z$, соответственно, заменены соответствующим набором петель BC, DE и FG, содержащих последовательности, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичные последовательностям петель BC, DE или FG клонов, перечисленных в таблице 1.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления описанный в настоящем документе антимиостатиновый аднектин определяется последовательность SEQ ID NO: 5 и содержит соответствующий набор последовательностей петель BC, DE и FG от любого из клонов, перечисленных в таблице 1. Например, клон 1979_B06 в таблице 1 содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 7, 39 и 46, соответственно. Таким образом, основанный на этих петлях антимиостатиновый аднектин может содержать SEQ ID NO: 5 или 6, причем $(Z)_x$ содержит SEQ ID NO: 7, $(Z)_y$ содержит SEQ ID NO: 39 и $(Z)_z$ содержит SEQ ID NO: 46. Подобные конструкции

предполагают использование набора петель BC, DE и FG от других клонов в таблице 1, или консенсусных последовательностей SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно. Каркасные области таких антимиостатиновых аднектинов могут содержать приблизительно от 0 до 20, от 0 до 15, от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замен, консервативных замен, делеций или добавлений, по сравнению с каркасными аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4. Такие каркасные модификации могут быть сделаны при условии, что антимиостатиновый аднектин способен связываться с миостатином с желаемой K_D .

Согласно предпочтительным вариантам осуществления петля BC антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SWSLPHAGHVN (SEQ ID NO: 7), SWVSPRGRAR (SEQ ID NO: 8), SWEVPRGLAR (SEQ ID NO: 9), SWWAPLGLAR (SEQ ID NO: 10), SWTLPHAGLAH (SEQ ID NO: 11), SWYLPYPAHMN (SEQ ID NO: 12), SWSLPFAGHLN (SEQ ID NO: 13), SWSLPYSGLAN (SEQ ID NO: 14), SWSLPHAGHAH (SEQ ID NO: 15), SWTLPNFGLIN (SEQ ID NO: 16), SWTLPHAGRAH (SEQ ID NO: 17), SWSLPYAGHLN (SEQ ID NO: 18), SWSLPYAAHMN (SEQ ID NO: 19), SWSLPYPGHLN (SEQ ID NO: 20), SWSLPYAGHAH (SEQ ID NO: 21), SWDAPGGLAR (SEQ ID NO: 22), SWSLPTPGLAH (SEQ ID NO: 23), SWSLPHRGVAN (SEQ ID NO: 24), SWSLPSSGVAH (SEQ ID NO: 25), SWSLPHHGFGH (SEQ ID NO: 26), SWSLPHAGDAH (SEQ ID NO: 27), SWSLPHNGVAH (SEQ ID NO: 28), SWSLPRQGLAN (SEQ ID NO: 29), SWSLPGPGHFH (SEQ ID NO: 30), SWSLPHPGGLGH (SEQ ID NO: 31), SWDAPRGLAR (SEQ ID NO: 32), SWDAPAGLAR (SEQ ID NO: 33), SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO: 34), SWDAPKGLAR (SEQ ID NO: 35), SWSLPNPGIAH (SEQ ID NO: 36), SWSLPRPGNAH (SEQ ID NO: 37) и SWSLPNPGNAH (SEQ ID NO: 38).

Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 7-38, как показано в таблице 1. Согласно одному варианту осуществления петля BC содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 34.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: PGRGVT (SEQ ID NO: 39), PGRGST (SEQ ID NO: 40), LGRGST (SEQ ID NO: 41), PGRGLT (SEQ ID NO: 42),

IGRGST (SEQ ID NO: 43), FGRGTT (SEQ ID NO: 44) и VGRGNT (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 39-45, как показано в таблице 1. Согласно одному варианту осуществления петля DE содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 39.

Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: TLTKSQMIHYMP (SEQ ID NO: 46), TIYRDGMSHHDP (SEQ ID NO: 47), TVYRDGPLLLAP (SEQ ID NO: 48), TIFRTGMVQYDP (SEQ ID NO: 49), TLTNSEILYKP (SEQ ID NO: 50), TLTKSQILHHRP (SEQ ID NO: 51), TLTRSKIIHYMP (SEQ ID NO: 52), TLTHSNIIRYVP (SEQ ID NO: 53), TVSSTKVIVYLP (SEQ ID NO: 54), TITKSTIIYKP (SEQ ID NO: 55), TVTTTSVILYKP (SEQ ID NO: 56), TLTKSQLIHYMP (SEQ ID NO: 57), TLTRSQVIHYMP (SEQ ID NO: 58), TLTKSKIIHYMP (SEQ ID NO: 59), TVSSTKVIHYKP (SEQ ID NO: 60), TLTKSKVIHYMP (SEQ ID NO: 61), TVTTTKVIHYKP (SEQ ID NO: 62), TIDRDGVNHFAP (SEQ ID NO: 63), TVTHHGVIGYKP (SEQ ID NO: 64), TLTGANVIIYKP (SEQ ID NO: 35), TVTNTGVIIYKP (SEQ ID NO: 66), TVTATGIIYKP (SEQ ID NO: 67), TVTRAGFYRYKP (SEQ ID NO: 68), TVTREEVISYKP (SEQ ID NO: 69), TVTAAGVIIYKP (SEQ ID NO: 70), TVTANQPIYKP (SEQ ID NO: 71), TITPETIIYKP (SEQ ID NO: 72), TIDRDGTRSFDP (SEQ ID NO: 73), TIFRDGPVTWDP (SEQ ID NO: 74), TVTDTGYLKYKP (SEQ ID NO: 75), TLTGSDTIFYKP (SEQ ID NO: 76), TVTGKDVIKYKP (SEQ ID NO: 77), TIFRDGVVNYGP (SEQ ID NO: 78) и TVTDTGFITYKP (SEQ ID NO: 79).

Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 46-79, как показано в таблице 1. Согласно одному варианту осуществления петля FG содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 75.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит одну последовательность петли BC, выбранную из последовательностей петель BC, содержащих SEQ ID NO: 7-38 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 7-38, как показано в таблице 1; одну последовательность петли DE выбирают из последовательностей петель DE, содержащих SEQ ID NO: 39-45 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 39-45,

как показано в таблице 1; и одну последовательность петли FG выбирают из последовательностей петель FG, содержащих SEQ ID NO: 46-79 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 46-79, как показано в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность петли BC, DE и FG, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность петель BC, DE и FG, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100 % идентичную подчеркнутой части любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно, как показано в таблице 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273 (полноразмерные последовательности из Таблицы 2, 5 и 6). Согласно одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную областям не-BC, DE и FG петель SEQ ID NO: 80-123, 228-239 и 252-273.

Согласно одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно. Согласно другому варианту осуществления антимиостатиновый аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 273 [PRD-1474], SEQ ID NO: 118 [3116_A06], SEQ ID NO: 281 [сердцевинная последовательность аднектина, разделенная PRD-1474 и 3116_A06, с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL) и с последующим C-концевым хвостом (EI)] или SEQ ID NO: 331 [сердцевинная последовательность аднектина PRD-

1474 и 3116_A06 без N-концевой лидерной последовательности или C-концевого хвоста]. Сердцевинная последовательность аднектина PRD-1474 и 3116_A06 представлена ниже:

EVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKP
GVDYTITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRT (SEQ ID NO: 331)

Согласно еще одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную областям не-BC, DE и FG петель SEQ ID NO: 118, 273, 281 или 331.

Согласно одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению и раскрытый в настоящем документе может быть описан по отношению к антимиостатиновому аднектину, содержащему петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления петля BC определяется консенсусной последовательностью X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} , где X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля DE содержит 1 аминокислотную замену, например, консервативную аминокислотную замену. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления петля DE определяется консенсусной последовательностью G-R-G- X_{40} , где X_{40} представляет собой L.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления петля FG определяется консенсусной последовательностью $X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}$, где X_{41} представляет собой L или I; X_{42} представляет собой S; X_{43} представляет собой K, R, A, G, C, H, N, T или P; X_{44} представляет собой S, A, E, H, K или N; X_{45} представляет собой K, Q, D, E, H, T или S; X_{46} представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X_{47} представляет собой I или Y; X_{48} представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X_{49} представляет собой H и X_{50} представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}$, где X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H, и петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле $G-R-G-X_{40}$, где X_{40} представляет собой L.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}$, где X_{33} представляет собой T или Y; X_{34} представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X_{35} представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X_{36} представляет собой A; X_{37} представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X_{38} представляет собой L, G, M, F, I или V и X_{39} представляет собой H, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}$, где X_{41} представляет собой L или I; X_{42} представляет собой S; X_{43} представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X_{44} представляет собой S, A, E, H, K или N; X_{45}

представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X₄₆ представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X₄₇, представляет собой I или Y; X₄₈ представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X₄₉ представляет собой H и X₅₀ представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативную аминокислотную замену, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X₄₀, где X₄₀ представляет собой L, и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄-X₄₅-X₄₆-X₄₇-X₄₈-X₄₉-X₅₀, где X₄₁ представляет собой L или I; X₄₂ представляет собой S; X₄₃ представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X₄₄ представляет собой S, A, E, H, K или N; X₄₅ представляет собой K, Q, D, E, N, T или S; X₄₆ представляет собой V, I, F, L, M, P или T; X₄₇ представляет собой I или Y; X₄₈ представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T; X₄₉ представляет собой H и X₅₀ представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₃₃-L-P-X₃₄-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉, где X₃₃ представляет собой T или Y; X₃₄ представляет собой Y, N, R, F, G, S или T; X₃₅ представляет собой A, P, S, F, H, N или R; X₃₆ представляет собой A; X₃₇ представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I; X₃₈ представляет собой L, G, M, F, I или V и X₃₉ представляет собой H; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X₄₀, где X₄₀ представляет собой L; и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄-X₄₅-X₄₆-X₄₇-X₄₈-X₄₉-X₅₀, где X₄₁ представляет собой L или I; X₄₂ представляет собой S; X₄₃ представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P; X₄₄ представляет собой S, A, E, H,

К или N; X₄₅ представляет собой К, Q, D, E, N, Т или S; X₄₆ представляет собой V, I, F, L, M, Р или Т; X₄₇ представляет собой I или Y; X₄₈ представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или Т; X₄₉ представляет собой H и X₅₀ представляет собой M, L, R или V.

Согласно одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, и содержит аминокислотные замены в петлях BC, DE и FG, которые позволяют антимиостатиновому аднектину поддерживать связывание с миостатином. Такие аминокислотные замены могут быть определены, например, с помощью глубокого мутационного сканирования, как описано в примере 8.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю BC, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₅₁-X₅₂-X₅₃-X₅₄-X₅₅-X₅₆-X₅₇-X₅₈-X₅₉, где X₅₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L, M и V; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G и S; X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления X₅₁ выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из P; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G; X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X₅₁ выбирают из группы, состоящей из F, S и W; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из P; X₅₄ выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G; X₅₇ выбирают из группы, состоящей

из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y; X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, G и L, и X₅₉ выбирают из группы, состоящей из H, N и Q.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю DE, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X₆₀, где X₆₀ представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V. Согласно предпочтительному варианту осуществления X₆₀ представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X₆₀ представляет собой C, E, I, L, M и V.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₆₁-X₆₂-X₆₃-X₆₄-X₆₅-X₆₆-X₆₇-X₆₈-X₆₉-X₇₀, где X₆₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₂ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₆ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y; X₆₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₉ выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и X₇₀ выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления X₆₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V; X₆₂ выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X₆₆ выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y; X₆₇ выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y; X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₉ выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления X₆₁ выбирают из группы, состоящей из I и V; X₆₂ выбирают из группы,

состоящей из C, F, I, L, M, T, V, W и Y; X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V; X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W; X₆₆ выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y; X₆₇ выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y; X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W; X₆₉ выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₅₁-X₅₂-X₅₃-X₅₄-X₅₅-X₅₆-X₅₇-X₅₈-X₅₉, где X₅₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₂ выбирают из группы, состоящей из L, M и V; X₅₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y; X₅₄ представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₆ выбирают из группы, состоящей из G и S; X₅₇ представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₅₈ представляет собой A, C, G, L, M, S и T; и X₅₉ представляет собой A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X₆₀, где X₆₀ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X₆₁-X₆₂-X₆₃-X₆₄-X₆₅-X₆₆-X₆₇-X₆₈-X₆₉-X₇₀, где X₆₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y; X₆₂ представляет собой A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₆ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y; X₆₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X₆₉ выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC

содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где X_{51} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y; X_{52} представляет собой L; X_{53} представляет собой P; X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{56} представляет собой G; X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y; X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и X_{59} выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G-R-G-X_{60}$, где X_{60} выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M, Q, T и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V; X_{62} представляет собой C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y; X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X_{66} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y; X_{67} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y; X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y; X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, причем петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где X_{51} выбирают из группы, состоящей из F, S и W; X_{52} представляет собой L; X_{53} представляет собой P; X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y; X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y; X_{56} представляет собой G; X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y; X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G и L; и X_{59} выбирают из группы, состоящей из H, N и Q; петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G-R-G-X_{60}$, где X_{60} выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M и V; и петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где X_{61} выбирают из группы, состоящей из I и V; X_{62}

представляет собой C, F, I, L, M, T, V, W и Y; X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V; X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y; X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W; X₆₆ выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y; X₆₇ выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y; X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W; X₆₉ выбирают из группы, состоящей из W и Y; и X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, как представлено в любой из SEQ ID NO: 124-167, 240-251 и 284-305 (полноразмерные последовательности из таблицы 2, 5 и 6). Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 124-167, 240-251 и 284-305.

Фибронектин в естественных условиях связывается с определенными типами интегринов через связывающий интегрин мотив, "аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту" (RGD). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит домен ¹⁰F_n3, который не содержит связывающий интегрин мотив (RGD). Связывающий интегрин домен может быть удален путем изменения последовательности RGD с помощью аминокислотной замены, делеции или вставки.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные последовательности петли BC, DE и/или FG, идентичные подчеркнутой части любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно, как показано в таблице 1, переносят в не представляющие собой домены ¹⁰F_n3 белковые каркасные элементы. Например, одна или несколько аминокислотных последовательностей петли обменивается на или вставляется в одну или несколько петель CDR тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента. Согласно другим вариантам осуществления домен белка, в который одна или несколько аминокислотных последовательностей петель обменивается или вставляется, включает в себя без ограничения консенсусные домены F_n3 (Centocor, US), белки с анкириновыми повторами (Molecular Partners AG, Zurich Switzerland), доменные антитела (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), однодоменные нанотела верблюда (Ablynx, Belgium), липокалины (например, антикалины; Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), авимеры (Amgen, CA), аффитела (Affibody AG, Sweden), убикитин (например, аффилины; Scil Proteins GmbH, Halle, Germany), миметики эпитопов

белков (Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland), каркасные элементы в виде спиральных тяжей (например, альфатела, Complix, Belgium), домены Fyn SH3 (Covagen AG, Switzerland) или атимеры (Anaphor, Inc., CA).

SEQ ID NO петель BC, DE и FG иллюстративных антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению представлены в таблице 1.

Таблица 1

Петли BC, DE и FG антимиостатиновых аднектинов						
Клон	Последовательности петель					
	Петля BC	SEQ ID NO:	Петля DE	SEQ ID NO:	Петля FG	SEQ ID NO:
1979_B06	SWSLPHAGHVN	7	PGRGVT	39	TLTKSQMIHYMP	46
2062_G02	SWVSPRGRAR	8	PGRGST	40	TIYRDGMSHHDP	47
2522_C09	SWEVPRGLAR	9	LGRGST	41	TVYRDGPLLLAP	48
2523_G06	SWWAPLGLAR	10	PGRGST	40	TIFRTGMVQYDP	49
2524_C11	SWTLPHAGLAH	11	PGRGVT	39	TLTNSEILYKP	50
2524_D09	SWYLPYPAHMN	12	PGRGLT	42	TLTKSQILHHRP	51
2524_E10	SWSLPFAGHLN	13	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2524_H05	SWSLPYAGHLN	14	PGRGVT	39	TLTHSNIIRYVP	53
2524_H11	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TVSSTKVIVYLP	54
2525_B01	SWTLPNFGLIN	16	PGRGVT	39	TITKSTIIYKP	55
2525_D02	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTSVILYKP	56
2525_D05	SWSLPYAGHLN	18	PGRGVT	39	TLTKSQLIHYMP	57
2525_F07	SWSLPYAAHMN	19	PGRGVT	39	TLTRSQVIHYMP	58
2987_A06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_C02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_D05	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E03	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E08	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIHYKP	60
2987_F01	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_F06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIVYLP	54
2987_H02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_H07	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTKVIHYKP	62

Петли BC, DE и FG антимиостатиновых аднектинов						
Клон	Последовательности петель					
	Петля BC	SEQ ID NO:	Петля DE	SEQ ID NO:	Петля FG	SEQ ID NO:
3006_A10	SWDAPGGLAR	22	IGRGST	43	TIDRDGVNHFAP	63
3007_B08	SWSLPTPGLAH	23	PGRGVT	39	TVTHHGVIKYKP	64
3007_C09	SWSLPHRGVAN	24	PGRGVT	39	TLTGANVVIKYKP	65
3007_C10	SWSLPSSGVAH	25	PGRGVT	39	TVTNTGVVIKYKP	66
3008_A03	SWSLPHHGFGH	26	PGRGVT	39	TVTATGIIKYKP	67
3008_B08	SWSLPHAGDAH	27	PGRGVT	39	TVTRAGFYRYKP	68
3008_D04	SWSLPHNGVAH	28	PGRGVT	39	TVTREEVISYKP	69
3008_F01	SWSLPRQGLAN	29	PGRGVT	39	TVTAAGVVIKYKP	70
3008_G01	SWSLPGPGHFH	30	PGRGVT	39	TVTANQPIIKYKP	71
3008_G03	SWSLPHPGGLGH	31	PGRGVT	39	TITPETIIVYKP	72
3115_D04	SWDAPRGLAR	32	FGRGTT	44	TIDRDGTRSFDP	73
3115_E06	SWDAPAGLAR	33	VGRGNT	45	TIFRDGPVTWDP	74
3116_A06	SWSLPHQGKAN	34	PGRGVT	39	TVTDTGYLKYKP	75
3116_A07	SWDAPKGLAR	35	VGRGNT	45	TIFRDGPVTWDP	74
3116_C01	SWSLPNPGIAH	36	PGRGVT	39	TLTGSDTIFYKP	76
3116_C06	SWSLPRPGNAH	37	PGRGVT	39	TVTGDVVIKYKP	77
3116_H06	SWDAPAGLAR	33	VGRGNT	45	TIFRDGVVNYGP	78
3146_A08	SWSLPNPGNAH	38	PGRGVT	39	TVTDTGFITYKP	79

SEQ ID NO иллюстративных антимиостатиновых моноаднектинов согласно настоящему изобретению представлены в таблице 2.

Таблица 2

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
1979_B06 также упоминается в настоящем документе как ATI-1133 (Сердцевинная последовательность 1 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u> ISWSLPHAGHVNYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSQM IHYPISINYRTEIDKPSQHNNH HHH (SEQ ID NO: 80)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCT GGTCATGTGAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACTAAATCTCAGATGATCCA TTACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 124)
2062_G02 также упоминается в настоящем документе как ATI-1134 (Сердцевинная последовательность 2 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u> ISWVSPRGRARYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGSTATISGL KPGVDYTITVYAVTIYRDGMS HNDPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 81)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGT CGTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTACCGTGACGGTATGTCTCATCAT GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 125)
2522_C09 (Сердцевинная последовательность 3 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u> ISWEVPRGLARYRITYGETG GNSPVQEFTVLGRGSTATISGL KPGVDYTITVYAVTVYRDGPL LLAPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 82)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGAAGTGCCGCGTGGC CTAGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCTTGGTCGTGGTTCTAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTGTGTACCGTGACGGGCGTGTCTTCTT GCCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 126)
2523_G06 (Сердцевинная последовательность 4 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u> ISWWAPLGLARYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGSTATISGL KPGVDYTITVYAVTIFRTGMV QYDPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 83)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTGGGCCCCGCTGGGT CTTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCCTGGTCGGGGCTCTAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGTACGGGCATGGTTCAATAT GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 127)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2524_C11 (Сердцевинная последовательность 5 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPHAGLAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPQVDYITIVYAVTLTNSEI LYKPISINYRTEIDKPSQHNNH H (SEQ ID NO: 84)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGACTCTGCCGCATGCT GGTCTTGCGCACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACTAATTCTGAGATTATCCTT TACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 128)
2524_D09 (Сердцевинная последовательность 6 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWYLPYPAHMNYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGLTATISG LKPQVDYITIVYAVTLTKSQIL HHRPISINYRTEIDKPSQHNNH H (SEQ ID NO: 85)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT GCGCATATGAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCT GACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACAAAATCTCAGATTCTCCA TCATAGGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 129)
2524_E10 (Сердцевинная последовательность 7 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6))	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPFAGHLNYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITIVYAVTLTRSKIIH YMPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 86)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCATTGCCGTTTGCTG GTCATTTGAACTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTTCGTGGTGT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTCGCTCTAAGATTATTCATTA TATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAG AAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCAC CACCACCAC (SEQ ID NO: 130)
2524_H05 (Сердцевинная последовательность 8 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYSGLANYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITIVYAVTLTHSNIIR YVPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 87)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCTTATTCTG GCCTTGCGAACTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTTCGTGGGGTT ACAGCTACTATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTCACTCTAATATAATTTCGAT ACGTGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 131)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2524_H11 (Сердцевинная последовательность 9 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVSSTKVI VYLPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 88)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCCCTACCGCATGCG GGTCATGCGCACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGAGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTGTCTAGTACAAAGGTGATAGT TTACCTGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 132)
2525_B01 (Сердцевинная последовательность 10 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPNFGLINYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTITKSTIIY KPISINYRTEIDKPSQHNNHHH (SEQ ID NO: 89)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGAATTTT GGTCTTATTAATTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGT CACTATCACCAAATCTACTATCATCATTTA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAG AAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCAC CACCACCAC (SEQ ID NO: 133)
2525_D02 (Сердцевинная последовательность 11 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPHAGRAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVTTTSVI LYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 90)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCT GGTCGTGCGCACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTGACGACAACTTCGGTGATCCT TTACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 134)
2525_D05 (Сердцевинная последовательность 12 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYAGHLNYYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSQLI HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 91)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTTCTTATGCTG GTCATCTAAACTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACATT ACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 135)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2525_F07 (Сердцевинная последовательность 13 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYAAHMNYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTRSQVI HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 92)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGTATGCT GCTCACATGAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACCTTTGACTAGATCACAGGTGATTCA TTACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 136)
2987_A06 (Сердцевинная последовательность 14 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSKII HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 93)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 137)
2987_B04 (Сердцевинная последовательность 15 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTLTKSKIIH YMPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 94)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 138)
2987_B09 (Сердцевинная последовательность 16 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPHAGRAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTRSKII HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 95)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCCGCAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 139)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2987_C02 (Сердцевинная последовательность 17 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSKII HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 96)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 140)
2987_D05 (Сердцевинная последовательность 18 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTRSKII HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 97)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCCGCAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 141)
2987_E03 (Сердцевинная последовательность 19 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTLTRSKIIH YMPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 98)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCCGCAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 142)
2987_E08 (Сердцевинная последовательность 20 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPHAGRAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVSSTKVI HYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 99)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCGTTAGCAGCACCAAGTGATTTCATTA TAAACCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 143)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2987_F01 (Сердцевинная последовательность 21 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL ISWSLPYAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTRSKII HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 100)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCCGCAGCAAAATTATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 144)
2987_F06 (Сердцевинная последовательность 22 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL ISWSLPHAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSKVI HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 101)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAGTGATTTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 145)
2987_G04 (Сердцевинная последовательность 23 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTLTKSKVI HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 102)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAGTGATTTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 146)
2987_G09 (Сердцевинная последовательность 24 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL ISWTLPHAGRAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVSSTKVI VYLPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 103)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCGTTAGCAGCACCAAAGTTATTGTTTA TCTGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 147)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
2987_H02 (Сердцевинная последовательность 25 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPYAGHAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTLTKSKVI HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 104)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGCGGTCTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCCTGACCAAAAGCAAAGTGATTCATTA TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 148)
2987_H07 (Сердцевинная последовательность 26 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWTLPHAGRAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVTTTKVI HYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 105)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCGCGGTCTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCGTTACCACCACCAAAGTGATTCATTA TAAACCGATTAGCATTAATTATCGCACCG AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT CACCATCAT (SEQ ID NO: 149)
3006_A10 (Сердцевинная последовательность 27 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWDAPGGLARYYRITYGETG GNSPVQEFTVIGRGSTATISGL KPGVDYTITVYAVTIDRDGVN HFAPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 106)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGGTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGATCGGTCTGGTAGCAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCGACCGTGACGGTGTCAACCACTTC GCCCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 150)
3007_B08 (Сердцевинная последовательность 28 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPTPLAHYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYTITVYAVTVTHHGV GYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 107)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGACTCCA GGTCTCGCCATTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCTGGTGT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTGTCACTCATCACGGCGTCATCGGCT ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 151)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
3007_C09 (Сердцевинная последовательность 29 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHRGVANYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPQVDYITIVYAVTLTGANV IYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HH (SEQ ID NO: 108)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGACCGT GGTGTGCGCAATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTCACTGGAGCGAACGTCATCAT CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 152)
3007_C10 (Сердцевинная последовательность 30 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPSSGVAHYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITIVYAVTVTNTGVII YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 109)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAGCAGC GGTGTGCGCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTCACTAACACTGGTGTCATCAT CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 153)
3008_A03 (Сердцевинная последовательность 31 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHHGFHYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITIVYAVTVTATGIII YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 110)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATCAC GGTTTCGGCCATTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGT CACTGTCACTGTACGGGGATCATCATCT ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 154)
3008_B08 (Сердцевинная последовательность 32 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHAGDAHYYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPQVDYITIVYAVTVTRAGF YRYKPISINYRTEIDKPSQHNNH HHH (SEQ ID NO: 111)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACGCC GGTGACGCCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTTACTAGAGCGGGTTTCTACCG CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 155)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
3008_D04 (Сердцевинная последовательность 33 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHNGVAHYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPQVDYITITVYAVTVTREEVI SYKPISINYRTEIDKPSQHNNHH HH (SEQ ID NO: 112)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATAAT GGTGTGCGCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTCACTCGGGAGGAAGTCATCAG CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 156)
3008_F01 (Сердцевинная последовательность 34 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPRQGLANYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITITVYAVTVTAAGVII YKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH H (SEQ ID NO: 113)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGTCAG GGTCTCGCCAATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTCACTGCTGCTGGGGTCATCAT CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 157)
3008_G01 (Сердцевинная последовательность 35 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPGPGHFHYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITITVYAVTVTANQPII YKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH H (SEQ ID NO: 114)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGGGACCG GGTCACTTCCATTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGT CACTGTCACTGCTAACCAGCCCATCATCT ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCAC (SEQ ID NO: 158)
3008_G03 (Сердцевинная последовательность 36 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHPLGHYYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL KPGVDYITITVYAVTITPETIIVY KPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH (SEQ ID NO: 115)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCCC GGTCTCGGCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCT GTCACTATCACTCCGGAACGATCATCGT CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 159)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
3115_D04 (Сердцевинная последовательность 37 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWDAPRGLARYYRITYGETG GNSPVQEFTVFGRGTTATISGL KPGVDYTITVYAVTIDRDGTR SFDPI SIN YRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 116)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGTTTCGGTCGTGGTACCAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCGACCGTGACGGTACCCGCAGCTTC GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 160)
3115_E06 (Сердцевинная последовательность 38 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWDAPAGLARYYRITYGETG GNSPVQEFTVVGRGNTATISG LKPGVDYTITVYAVTIFRDGPV TWDPISIN YRTEIDKPSQHNNHH HH (SEQ ID NO: 117)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 161)
3116_A06 (Сердцевинная последовательность 39 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPHQGKANYRITYGET GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG LKPGVDYTITVYAVTVTDTGY LKYKPISIN YRTEIDKPSQHNNH HHH (SEQ ID NO: 118)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAA GGTAAAGCCAATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCAGTGTACTGATACAGGGTACCTCAA GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 162)
3116_A07 (Сердцевинная последовательность 40 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWDAPKGLARYYRITYGETG GNSPVQEFTVVGRGNTATISG LKPGVDYTITVYAVTIFRDGPV TWDPISIN YRTEIDKPSQHNNHH HH (SEQ ID NO: 119)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 163)

Антимиостатиновые моноаднектины		
	Последовательность	
	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
3116_C01 (Сердцевинная последовательность 41 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPNPGIAHYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVATISGL KPGVDYTITVYAVTLTGSDTIF YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 120)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCC GGTATCGCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTCACTGGCAGTGACACCATCTT CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 164)
3116_C06 (Сердцевинная последовательность 42 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPRPGNAHYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVATISGL KPGVDYTITVYAVTVTGKDV KYKPISINYRTEIDKPSQHNNHH HH (SEQ ID NO: 121)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGGCCG GGTAACGCCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTTACTGGCAAAGATGTCATCAA GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 165)
3116_H06 (Сердцевинная последовательность 43 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWDAPAGLARYRITYGETG GNSPVQEFTVVGRGNTATISG LKPGVDYTITVYAVTIFRDGV VNYGPISINYRTEIDKPSQHNNH HHH (SEQ ID NO: 122)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGTGACGGTGTCTCAACTAC GGCCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC ACCACCAC (SEQ ID NO: 166)
3146_A08 (Сердцевинная последовательность 44 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLL ISWSLPNPGNAHYRITYGETG GNSPVQEFTVPGRGVATISGL KPGVDYTITVYAVTVDTGFI YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH H (SEQ ID NO: 123)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCG GGTAACGCCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTTACTGACACAGGTTTCATCAC GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 167)

Перекрестно конкурирующие аднектины и/или аднектины, которые связываются с тем же сайтом связывания аднектина

Согласно одному варианту осуществления аднектины согласно настоящему изобретению конкурируют (например, перекрестно конкурируют) за связывание с

миостатином с конкретными описанными в настоящем документе антимиостатиновыми аднектинами. Такие конкурирующие аднектины могут быть идентифицированы на основании их способности конкурентно ингибировать связывание с миостатином описанных в настоящем документе аднектинов в стандартных анализах связывания миостатина. Например, могут быть использованы стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок-миостатин иммобилизуют на планшете, один из аднектинов флуоресцентно метят и оценивают способность немеченых аднектинов конкурировать за связывание с меченым аднектином.

Согласно одному варианту осуществления конкурентный формат ELISA может быть выполнен, чтобы определить связываются ли два антимиостатиновых аднектина, перекрывая аднектиновый сайт связывания на миостатине. В одном формате аднектин #1 наносят на планшет, а затем блокируют и промывают. К этому планшету добавляют либо только миостатин, либо миостатин, предварительно инкубированный с насыщающей концентрацией аднектина #2. После соответствующего инкубационного периода планшеты промывают и зондируют с поликлональным антимиостатиновым антителом, таким как биотинилированное козье антимиостатиновое поликлональное антитело (R&D Systems), с последующим обнаружением с конъюгатом стрептавидин-HRP и стандартными процедурами развития тетраметилбензидина. Если сигнал OD одинаковый с или без предварительной инкубации с аднектином #2, то два аднектина связываются независимо друг от друга и их аднектиновые сайты связывания не перекрываются. Если, однако, сигнал OD для лунок, которые получили смеси миостатина/аднектина #2 ниже, чем для тех, которые получили один миостатин, значит, подтверждается, что связывание аднектина #2 блокирует связывание аднектина #1 с миостатином.

Альтернативно, подобный эксперимент проводят с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR, например, BIAcore). Аднектин #1 иммобилизуют на поверхности чипа SPR с последующим введением либо только миостатина, либо миостатина, предварительно инкубированного с насыщающей концентрацией аднектина #2. Если сигнал связывания смесей миостатина/аднектина #2 такой же или выше, чем у одного миостатина, значит, два аднектина связываются независимо друг от друга и их сайты связывания аднектина не перекрываются. Если, однако, сигнал связывания смесей миостатина/аднектина #2 ниже сигнала связывания для одного миостатина, то подтверждается, что связывание аднектина #2 блокирует связывание

аднектина #1 с миостатином. Особенность этих экспериментов заключается в использовании насыщающих концентраций аднектина #2. Если миостатин не насыщен аднектином #2, то вышеизложенные выводы не подтверждаются. Подобные эксперименты могут быть использованы для определения того, связываются ли любые два связывающих миостатин белка с перекрытием аднектиновых сайтов связывания.

Оба анализа, примеры которых приведены выше, также могут быть выполнены в обратном порядке, где аднектин #2 иммобилизуют и миостатин-аднектин #1 добавляют к планшету. Альтернативно, аднектин #1 и/или #2 может быть заменен моноклональным антителом и/или растворимым слитым белком рецептор-Fc.

Согласно другому варианту осуществления конкуренция может быть определена с использованием сэндвич-анализа HTRF, как описано в примере 4.

Согласно другим вариантам осуществления конкурирующий аднектин представляет собой аднектин, который связывается с тем же сайтом связывания аднектина на миостатине, в частности, описанный в настоящем документе антимиостатиновый аднектин. Могут быть использованы стандартные техники картирования, такие как протеазное картирование, мутационный анализ, рентгеновская кристаллография и 2-мерный ядерный магнитный резонанс, чтобы определить, связывается ли аднектин с тем же сайтом связывания аднектина в качестве эталонного аднектина (смотрите, например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Кандидатные конкурирующие антимиостатиновые аднектины могут ингибировать связывание антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению с миостатином по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. Процент конкуренции может быть определен с использованием описанных выше способов.

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы, которые конкурируют с антимиостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению, не обязательно должны представлять собой аднектин, а могут представлять собой любой тип молекулы, которая связывается с миостатином, такой как без ограничения антитело, небольшую молекулу, пептид и тому подобное.

Согласно некоторым вариантам осуществления аднектины согласно настоящему изобретению связываются с прерывающимся сайтом связывания аднектина на миостатине. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды связываются с областью в пределах аминокислот 55-66 миостатина (SEQ ID NO: 3). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды связываются с областью в пределах аминокислот 85-101 миостатина (SEQ ID NO: 3). Согласно еще другим вариантам осуществления полипептиды связываются в пределах двух областей, аминокислот 85-101 и 55-66, миостатина (SEQ ID NO: 3).

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению не конкурируют за связывание с миостатином с ActRIIB. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению конкурируют за связывание с миостатином с ALK4 и/или ALK5.

II. Удлиненные последовательности

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, чтобы содержать N-концевую последовательность удлинения и/или C-концевое удлинение. Например, последовательность MG может быть помещена на N-конце ¹⁰Fn3, определенной SEQ ID NO: 4. M, как правило, будут отщеплять, оставляя G на N-конце. Альтернативно, первые 10 аминокислот антимиостатиновых аднектинов, показанных в таблице 2, могут быть заменены на альтернативную N-концевую последовательность, называемую в настоящем документе как N-концевые удлинения, как показано в таблице 7. Кроме того, M, G или MG могут также быть помещены N-терминально по отношению к любому из N-концевых удлинений, представленных в таблице 7. Описанные в настоящем документе антимиостатиновые аднектины могут также содержать альтернативные C-концевые хвостовые последовательности, называемые в настоящем документе C-концевыми последовательностями удлинения. Например, антимиостатиновые аднектиновые последовательности, представленные в таблице 2, могут быть усечены по треонину, соответствующему T94 из SEQ ID NO: 4 (т.е., усеченная после INYRT (SEQ ID NO: 168) часть последовательности). Такой усеченный вариант может быть использован в качестве терапевтических молекул в усеченной форме, или альтернативные C-концевые удлинения могут быть добавлены после остатка треонина. Иллюстративные C-концевые последовательности удлинения показаны в таблице 7. Иллюстративные антимиостатиновые аднектины, содержащие C-концевые последовательности удлинения, показаны в таблице 2, как SEQ ID NO:

80-123. Например, SEQ ID NO: 80 (клон 1979_B06) содержит встречающееся в природе С-концевое удлинение EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) с последующим тегом His6 (SEQ ID NO: 328). Тем не менее, следует понимать, что метка His6 не представляет собой обязательную.

Согласно некоторым вариантам осуществления С-концевые последовательности удлинения (также называемые "хвосты"), содержат остатки E и D, и могут составлять от 8 до 50, от 10 до 30, от 10 до 20, от 5 до 10 и от 2 до 4 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления хвостовые последовательности включают в себя основанные на ED линкеры, в которых последовательность содержит тандемные повторы ED. В иллюстративных вариантах осуществления хвостовая последовательность содержит от 2 до 10, от 2 до 7, от 2 до 5, от 3 до 10, от 3 до 7, от 3 до 5, 3, 4 или 5 повторов ED. Согласно некоторым вариантам осуществления основанные на ED хвостовые последовательности могут также включать в себя дополнительные аминокислотные остатки, такие как, например: EI, EID, ES, EC, EGS и EGC. Такие последовательности основаны, в частности, на известных хвостовых последовательностях аднектина, таких как EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211), в которых остатки D и K были удалены. Согласно иллюстративным вариантам осуществления основанный на ED хвост содержит остатки E, I или EI перед повторами ED.

Согласно другим вариантам осуществления N- или С-концевые последовательности могут быть объединены с известными линкерными последовательностями (например, SEQ ID NO: 181-227 в таблице 4), что необходимо при разработке слитой молекулы антимиостатинового аднектина. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности могут быть размещены на С-конце домена $^{10}\text{Fn3}$, чтобы облегчить прикрепление фармакокинетического фрагмента. Например, цистеин, содержащий линкер, такой как GSGC (SEQ ID NO: 189), может быть добавлен к С-концу для облегчения сайт-направленного пегилирования на остатке цистеина. Иллюстративные антимиостатиновые аднектины, содержащие цистеин-содержащий линкер, показаны в таблице 5 в SEQ ID NO: 228-239.

III. Фармакокинетические фрагменты

Согласно одному аспекту в настоящей заявке предусмотрены антимиостатиновые аднектины, дополнительно содержащие фармакокинетический (PK) фрагмент. Улучшенная фармакокинетика может быть оценена в соответствии с предполагаемой терапевтической необходимостью. Часто желательно увеличить биодоступность и/или увеличить время между дозами, возможно, за счет увеличения времени, в течение

которого белок остается доступным в сыворотке после введения дозы. В некоторых случаях желательно улучшить постоянство концентрации сывороточного белка с течением времени (например, уменьшить разницу в сывороточной концентрации белка вскоре после введения и незадолго до следующего введения). Антимииостатиновый аднектин может быть присоединен к фрагменту, который уменьшает скорость выведения полипептида у млекопитающего (например, мыши, крысы или человека) более чем в два раза, более чем в три раза, более чем в четыре раза или более чем в пять раз, по сравнению с немодифицированным антимииостатиновым аднектином. Другие меры улучшенной фармакокинетики могут включать в себя время полужизни в сыворотке, которое часто делится на фазу альфа и фазу бета. Одна или обе фазы могут быть значительно улучшены путем добавления соответствующего фрагмента. Например, РК фрагмент может увеличить время полужизни в сыворотке полипептида более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% или более по отношению только к домену Fn3.

Фрагменты, которые замедляют выведение белка из крови, называемые в настоящем документе "Fn3 фрагменты", включают в себя полиоксиалкиленовые фрагменты (например, полиэтиленгликоль), сахара (например, сиаловая кислота) и хорошо переносимые белковые фрагменты (например, Fc и их фрагменты и варианты, трансферрин или сывороточный альбумин). Антимииостатиновый аднектин также может быть слит с альбумином или фрагментом (частью) или вариантом альбумина, как описано в публикации США № 2007/0048282, или может быть слит с одним или несколькими описанными в настоящем документе связывающими сывороточный альбумин аднектинами.

Другие РК фрагменты, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают в себя те, которые описаны в Kontermann et al., (*Current Opinion in Biotechnology* 2011;22:868-76), который включен в настоящий документ посредством ссылки. Такие РК фрагменты включают в себя без ограничения слияния человеческого сывороточного альбумина, конъюгаты человеческого сывороточного альбумина, связывающие человеческого сывороточного альбумина (например, Adnectin PKE, AlbuAb, ABD), слияния XTEN, слияния PAS (т.е. миметики рекомбинантного ПЭГ на основе трех аминокислот пролина, аланина и серина), углеводные конъюгаты (например, гидроксиэтилкрахмал (ГЭК)), гликозилирование, конъюгаты полисиаловой кислоты и жирных кислот.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимиостатиновый аднектин, слитый с РК фрагментом, который представляет собой полимерный сахар. Согласно некоторым вариантам осуществления РК фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль или фрагмент области Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления РК фрагмент представляет собой связывающий сывороточный альбумин белок, такой как те, которые описаны в публикации США № 2007/0178082 и 2007/0269422. Согласно некоторым вариантам осуществления РК фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам осуществления РК фрагмент представляет собой трансферрин.

Полиэтиленгликоль

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ представляет собой хорошо известный водорастворимый полимер, который представляет собой коммерчески доступный или может быть получен путем полимеризации с раскрытием кольца этиленгликоля в соответствии со способами, хорошо известными в настоящей области техники (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Термин "ПЭГ" используется в широком смысле, чтобы охватить любую молекулу полиэтиленгликоля, безотносительно к размеру или к модификации на конце ПЭГ, и может быть представлен следующей формулой: $X-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2OH$, где n составляет от 20 до 2300 и X представляет собой H или конечную модификацию, например, C₁₋₄ алкил. ПЭГ может содержать дополнительные химические группы, которые необходимы для реакций связывания, которые представляют собой результат химического синтеза молекулы или которые действуют как спейсеры для оптимального расстояния частей молекулы. Кроме того, такой ПЭГ может состоять из одной или нескольких боковых цепей ПЭГ, которые связаны друг с другом. ПЭГ с более чем одной цепью ПЭГ называются многоплечими или разветвленными ПЭГ. Разветвленные ПЭГ описаны, например, в Европейской опубликованной заявке № 473084A и в патенте США № 5932462.

Одна или несколько молекул ПЭГ могут быть присоединены в различных положениях к белку, и такое присоединение может быть осуществлено путем реакции с аминами, тиолами или других подходящими реакционноспособными группами. Фрагмент амина может представлять собой, например, первичный амин, найденный на N-конце полипептида, или аминную группу, присутствующую в аминокислоте, такую как

лизин или аргинин. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент ПЭГ присоединяют в положении на полипептиде, выбранном из группы, состоящей из: а) N-конца; б) между N-концом и наиболее N-терминальной бета-цепью или подобной бета-цепью; в) петли, расположенной на лицевой стороне полипептида напротив сайта связывания-мишени; д) между С-концом и наиболее С-концевой бета-цепью или подобной бета-цепью и е) на С-конце.

Пегилирование может быть достигнуто путем сайт-направленного пегилирования, причем соответствующую реакционно-способную группу вводят в белок, чтобы создать сайт, где преимущественно происходит пегилирование. Согласно некоторым вариантам осуществления белок модифицируют, чтобы ввести остаток цистеина в желаемом положении, что позволяет сайт-направленное пегилирование на цистеине. Мутации могут быть введены в кодирующую белок последовательность для получения остатков цистеина. Это может быть достигнуто, например, путем мутации одного или нескольких аминокислотных остатков в цистеин. Предпочтительные аминокислоты для мутации с остатком цистеина включают в себя серин, треонин, аланин и другие гидрофильные остатки. Предпочтительно, остаток для мутирования в цистеин представляет собой экспонированный на поверхности остаток. Алгоритмы хорошо известны в настоящей области техники для прогнозирования поверхностной доступности остатков на основе первичной последовательности или белка. Альтернативно, поверхностные остатки можно предсказать путем сравнения аминокислотных последовательностей связывающих полипептидов, при условии, что кристаллическая структура рамки, на основе которых связывающие полипептиды разрабатываются и развиваются, была решена (смотрите, Himanen et al., *Nature* 2001;414:933-8) и, следовательно, экспонированные на поверхности остатки определены. Пегилирование остатков цистеина может быть осуществлено с использованием, например, ПЭГ-малеимида, ПЭГ-винилсульфона, ПЭГ-иодацетамида или ПЭГ-ортопиридилдисульфида.

ПЭГ, как правило, активируют подходящей активирующей группой, пригодной для присоединения к желаемому сайту на полипептиде. Способы пегилирования хорошо известны в настоящей области техники и дополнительно описаны в Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992) и в Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16: 157-182.

ПЭГ может изменяться в широких пределах молекулярной массы и может быть разветвленным или линейным. Как правило, средневесовая молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 100 Дальтон до приблизительно 150000 Дальтон. Иллюстративные средневесовые молекулярные массы для ПЭГ включают в себя приблизительно 20000 дальтон, приблизительно 40000 дальтон, приблизительно 60000 Дальтон и приблизительно 80000 дальтон. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет 40000 дальтон. Разветвленные версии ПЭГ, характеризующиеся общей молекулярной массой любого из вышеперечисленных, также могут быть использованы. Согласно некоторым вариантам осуществления ПЭГ содержит две ветви. Согласно другим вариантам осуществления ПЭГ содержит четыре ветви. Согласно другому варианту осуществления ПЭГ представляет собой бис-ПЭГ (NOF Corporation, DE-200MA), в котором два аднектина конъюгированы (смотрите, например, пример 1 и АТИ-1341 в таблице 5).

Обычные техники разделения и очистки, известные в настоящей области техники, могут быть использованы для очистки пегилированных антимиостатиновых аднектинов, такие как эксклюзионная (например, гель-фильтрация) и ионообменная хроматография. Продукты могут также быть разделены с использованием ДСН-ПААГ. Продукты, которые могут быть разделены, включают в себя моно-, ди-, три-, поли- и непегилированные аднектины, а также свободный ПЭГ. Процент конъюгатов моно-ПЭГ можно контролировать путем объединения более широких фракций вокруг пика элюции для повышения процента моно-ПЭГ в композиции. Приблизительно 90% конъюгатов моно-ПЭГ представляют собой хороший баланс выхода и активности.

Согласно некоторым вариантам осуществления пегилированные антимиостатиновые аднектины будут предпочтительно сохранять по меньшей мере приблизительно 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% биологической активности, связанной с немодифицированным антимиостатиновым аднектином. Согласно некоторым вариантам осуществления биологическая активность относится к его способности связываться с миостатином, что оценено с помощью K_D , k_{on} или k_{off} . Согласно некоторым вариантам осуществления пегилированный антимиостатиновый аднектин показывает увеличение в связывании с миостатином по отношению к непегилированному антимиостатиновому аднектину.

Иллюстративные ПЭГ-модифицированные антимиостатиновые аднектины приведены в таблице 5.

Домен Fc иммуноглобулина (и фрагменты)

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин сливают с Fc-доменом иммуноглобулина или его фрагментом или вариантом. Используемый в настоящем документе термин "функциональная область Fc" представляет собой домен Fc или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с FcRn. Согласно некоторым вариантам осуществления функциональная область Fc связывается с FcRn, но не обладает эффекторной функцией. Способность области Fc или ее фрагмента связываться с FcRn может быть определена с помощью стандартных анализов связывания, известных в настоящей области техники. Согласно другим вариантам осуществления область Fc или ее фрагмент связывается с FcRn и обладает по меньшей мере одной "эффекторной функцией" нативной области Fc. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют комбинации области Fc со связывающим доменом (например, антимиостатиновым аднектином) и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в настоящей области техники для оценки таких эффекторных функций антитела.

"Нативная последовательность области Fc" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. "Вариантная область Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области Fc по меньшей мере одной модификацией аминокислоты. Предпочтительно, вариантная область Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, а предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. Вариантная область Fc в настоящем документе будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности с нативной последовательностью области Fc или области Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с ними, более

предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности с ними.

Согласно иллюстративному варианту осуществления область Fc получают из подкласса IgG1, однако, и другие подклассы (например, IgG2, IgG3 и IgG4) также могут быть использованы. Ниже показана последовательность домена Fc человеческого иммуноглобулина IgG1:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO: 169)

Последовательность сердцевинной петли подчеркнута, и области CH2 и CH3 представлены обычным текстом. Следует понимать, что С-концевой лизин представляет собой необязательный.

Слияние может быть образовано путем присоединения антимиостатинового аднектина к обоим концам молекулы Fc, т.е. положениям Fc-антимиостатиновый аднектин или антимиостатиновый аднектин-Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc и антимиостатиновый аднектин сливаются через линкер. Иллюстративные линкерные последовательности включают в себя GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181), EPKSSD (SEQ ID NO: 182), D, ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA (SEQ ID NO: 183), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 184), GQPDEPGGS (SEQ ID NO: 185), GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 186), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO: 187), GSGSG (SEQ ID NO: 188), GSGC (SEQ ID NO: 189), AGGGGSG (SEQ ID NO: -190), GSGS (SEQ ID NO: 191), QPDEPGGS (SEQ ID NO: 192), GSGSGS (SEQ ID NO: -193), TVAAPS (SEQ ID NO: 194), KAGGGGSG (SEQ ID NO: 195), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 196), KQPDEPGGS (SEQ ID NO: 197), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO: 198), KTVAAPS (SEQ ID NO: 199), KAGGGGSGG (SEQ ID NO: 200), KGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 201), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO: 202), KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO: 203), KTVAAPSG (SEQ ID NO: 204), AGGGGSGG (SEQ ID NO: 205), AGGGGSG (SEQ ID NO: 206), GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 207), QPDEPGGSG (SEQ ID NO: 208) и TVAAPSG (SEQ ID NO: 209)

Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc, используемая в слиянии антимиостатинового аднектина, содержит шарнирную область молекулы Fc. Используемая в настоящем документе "шарнирная" область содержит сердцевинные

шарнирные остатки, охватывающие положения 1-16 из SEQ ID NO: 169 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 170) области Fc IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления слияние антимиостатиновый аднектин-Fc принимает многомерную структуру (например, димер) из-за, в частности, остатков цистеина в положениях 6 и 9 SEQ ID NO: 169 внутри шарнирной области. Согласно другим вариантам осуществления используемая в настоящем документе шарнирная область может дополнительно включать в себя остатки, полученные из областей CH1 и CH2, которые фланкируют последовательность сердцевинной петли, как показано в SEQ ID NO: 169. Согласно еще другим вариантам осуществления шарнирная последовательность представляет собой GSTHTCPPCPAPELLG (т.е., шарнирная последовательность для PRD-932; SEQ ID NO: 180).

Согласно некоторым вариантам осуществления шарнирная последовательность может включать в себя замены, которые придают желаемые фармакокинетические, биофизические и/или биологические свойства. Некоторые иллюстративные шарнирные последовательности включают в себя EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 171; сердцевинная шарнирная область подчеркнута), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO 172; сердцевинная шарнирная область подчеркнута), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 173; сердцевинная шарнирная область подчеркнута), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 174; сердцевинная шарнирная область подчеркнута) и DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 175; сердцевинная шарнирная область подчеркнута). Согласно одному варианту осуществления остаток Р в положении 18 SEQ ID NO: 169 был замещен S для абляции эффекторной функции Fc; это замещение иллюстрируется в шарнирах, содержащих какую-либо одну из SEQ ID NO: 172, 173 и 175. Согласно другому варианту осуществления остатки DK в положениях 1-2 SEQ ID NO: 169 были заменены на GS для удаления потенциального клип-сайта; это замещение проиллюстрировано в SEQ ID NO: 173. Согласно другому варианту осуществления C в положении 103 SEQ ID NO: 176, которая соответствует константной области тяжелой цепи IgG1 человека (т.е. доменам CH1-CH3), был замещен на S, чтобы предотвратить неправильную цистеиновую связь в отсутствие легкой цепи; это замещение проиллюстрировано в SEQ ID NO: 171-173.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 176)

Согласно некоторым вариантам осуществления слияние антимиостатинового аднектин-Fc может характеризоваться следующей конфигурацией: 1) антимиостатиновый аднектин-шарнир-Fc или 2) шарнир-Fc-антимиостатиновый аднектин. Таким образом, любой антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению может быть слит с областью Fc, содержащей шарнирную последовательность в соответствии с этими конфигурациями. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер может быть использован, чтобы присоединить антимиостатиновый аднектин к фрагменту шарнир-Fc, например, иллюстративный слитый белок может характеризоваться конфигурацией антимиостатиновый аднектин-линкер-шарнир-Fc или шарнир-Fc-линкер-антимиостатиновый аднектин. Кроме того, в зависимости от системы, в которой получают слитый полипептид, лидерную последовательность можно разместить на N-конце слитого полипептида. Например, если слияние производится в системе млекопитающих, лидерная последовательность, такая как METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177), может быть добавлена к N-концу слитой молекулы. Если сливание производится в E.coli, слитая последовательность будет с предшествующим метионином.

Следующая последовательность представляет собой пример конструкта антимиостатиновый аднектин-шарнир-Fc:

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFVTPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTEIEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (PRD-1171; SEQ ID NO: 253). Лидерная последовательность выделена жирным шрифтом, последовательность антимиостатинового аднектина - курсивом и шарнирная область подчеркнута. Следует понимать, что C-концевой лизин представляет собой необязательный.

В настоящем документе область Fc содержит области CH2 и CH3 IgG1 человека следующим образом:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 178) и
шарнирная последовательность DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170).

Следующая последовательность представляет собой пример конструктора Fc-
антимюстатинный аднектин:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
ELQLEESAEEAQEGELEGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYRITYGETG
GNSPVQEFVTPGRGVTATISGLKPGVDYITTVYAVTVTDGTGLKYKPISINYRTEI (PRD-
1474; SEQ ID NO: 273). Шарнирная область подчеркнута, лидерная
последовательность выделена жирным шрифтом, а последовательность
антимюстатинного аднектина - курсивом.

В настоящем документе область Fc содержит области CH2 и CH3 IgG1 человека
следующим образом:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 179) и
шарнирная последовательность DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170).

Иллюстративные слияния антимюстатинного аднектина-Fc и слияния Fc-
антимюстатинного аднектина приведены в таблице 6 (SEQ ID NO: 252-273). Все
последовательности могут начинаться с метионина или лидерной последовательности
млекопитающего (например, SEQ ID NO: 177).

Аднектины

Согласно некоторым вариантам осуществления РК фрагмент представляет собой
другой аднектин, специфический, например, к сывороточному белку (например,
человеческому сывороточному альбумину), как описано в US 2012/0094909, который
полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Другие РК
фрагменты, которые могут быть использованы с аднектинами согласно настоящему
изобретению, описаны в Kontermann et al. (*Current Opinion in Biotechnology*
2011;22:868-76), как обсуждалось выше. В качестве примера, такие основанные на

аднектине РК фрагменты могут быть прямо или косвенно связаны с антимиостатиновым аднектином посредством полипептидного линкера. Подходящие линкеры для присоединения доменов Fn3 представляют собой те, которые позволяют отдельные домены складывать независимо друг от друга и образовывать трехмерную структуру, которая позволяет высокоаффинное связывание с молекулой-мишенью. Иллюстративные полипептидные линкеры включают в себя PSTSTST (SEQ ID NO: 210), EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) и GS линкеры, такие как GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 213) и их мультимеры. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. Эти линкеры содержат остатки глицина и серина и могут составлять в пределах от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот в длину. Примеры включают в себя линкеры, содержащие аминокислотную последовательность (GS)₇ (SEQ ID NO: 215), G(GS)₆ (SEQ ID NO: 216) и G(GS)₇G (SEQ ID NO: 217). Другие линкеры содержат глутаминовую кислоту и включают в себя, например, (GSE)₅ (SEQ ID NO: 218) и GGSEGGSE (SEQ ID NO: 219). Другие иллюстративные глицин-сериновые линкеры включают в себя (GS)₄ (SEQ ID NO: 212), (GGGS)₇ (SEQ ID NO: 220), (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 221) и (GGGS)₃G (SEQ ID NO: 222). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-пролина. Эти линкеры содержат глициновые и пролиновые остатки и могут составлять от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 аминокислот в длину. Примеры включают в себя линкеры, содержащие аминокислотную последовательность (GP)₃G (SEQ ID NO: 223), (GP)₅G (SEQ ID NO: 224) и GPG. Согласно другим вариантам осуществления линкер может представлять собой основанный на пролине-аланине линкер, составляющий от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 аминокислот в длину. Примеры линкеров на основе пролина и аланина включают в себя, например, (PA)₃ (SEQ ID NO: 225), (PA)₆ (SEQ ID NO: 226) и (PA)₉ (SEQ ID NO: 227). Оптимальная длина линкера и аминокислотная композиция может быть определена с помощью обычных экспериментов в рассмотрении представленных в настоящем документе учений. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин связан, например, с аднектином к HSA посредством полипептидного линкера, содержащего сайт протеазы, который расщепляется с помощью протеазы в крови или ткани-мишени. Такие варианты осуществления могут быть использованы для высвобождения антимиостатинового аднектина для лучшей доставки или терапевтических свойств, или более эффективного производства.

Дополнительные линкеры или спейсеры могут быть введены на N-конце или C-конце домена Fn3 между доменом Fn3 и полипептидным линкером.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин может быть прямо или косвенно связан, например, с аднектином к HSA с помощью полимерного линкера. Полимерные линкеры могут быть использованы для оптимального изменения расстояния между каждым компонентом слияния для создания белкового слияния с одной или несколькими из следующих характеристик: 1) уменьшенным или увеличенным пространственным затруднением связывания одного или нескольких доменов белка при связывании с представляющим интерес белком, 2) повышенной стабильностью или растворимостью белка, 3) уменьшенной агрегацией белка и 4) увеличенной общей авидностью или аффинностью белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин связан, например, с аднектином к HSA с помощью биосовместимого полимера, такого как полимерный сахар. Полимерный сахар может включать в себя ферментативный сайт расщепления, который расщепляется с помощью фермента в крови или ткани-мишени. Такие варианты осуществления могут быть использованы для высвобождения антимиостатинового аднектина для лучшей доставки или терапевтических свойств или более эффективного производства.

Краткий обзор моноаднектинов и их соответствующих модифицированных форм РК фрагментов (например, пегилированные и слияния Fc) представлены в таблице 3.

Таблица 3

Моно-аднектин ^a	Цистеиновый мутант [модификация]^b	X-линкер-Fc^c	Fc-линкер-X^d
1979_B06 (SEQ ID NO: 80)	ATI-1107 (SEQ ID NO: 229) [40k 2 вет.]		
2062_G02 (SEQ ID NO: 81)	ATI-1106 (SEQ ID NO: 228) [40k 2 вет.]		
2522_C09 (SEQ ID NO: 82)			
2523_G06 (SEQ ID NO: 83)			

Моно- аднектин^a	Цистеиновый мутант [модификация]^b	X-линкер-Fc^c	Fc-линкер-X^d
83)			
2524_C11 (SEQ ID NO: 84)			
2524_D09 (SEQ ID NO: 85)	ATI-1275 (SEQ ID NO: 231) [NEM]; ATI-1276 (SEQ ID NO: 231) [40k 2 вст.]		
2524_E10 (SEQ ID NO: 86)			
2524_H05 (SEQ ID NO: 87)			
2524_H11 (SEQ ID NO: 88)			
2525_B01 (SEQ ID NO: 89)			
2525_D02 (SEQ ID NO: 90)	ATI-1267 (SEQ ID NO: 230) [NEM]; ATI-1266 (SEQ ID NO: 230) [40k 2 вст.]		
2525_D05 (SEQ ID NO: 91)	ATI-1277 (SEQ ID NO: 232) [NEM]; ATI-1278 (SEQ ID NO: 232) [40k 2 вст.]		PRD-932 [L1] (SEQ ID NO: 252)
2525_F07 (SEQ ID NO: 92)			
2987_A06 (SEQ ID NO: 93)			
2987_B04 (SEQ ID NO: 94)			
2987_B09 (SEQ ID NO: 95)			

Моно-аднектин^a	Цистеиновый мутант [модификация]^b	Х-линкер-Fc^c	Fc-линкер-Х^d
2987_C02 (SEQ ID NO: 96)			
2987_D05 (SEQ ID NO: 97)			
2987_E03 (SEQ ID NO: 98)			
2987_E08 (SEQ ID NO: 99)			
2987_F01 (SEQ ID NO: 100)			
2987_F06 (SEQ ID NO: 101)			
2987_G04 (SEQ ID NO: 102)			
2987_G09 (SEQ ID NO: 103)			
2987_H02 (SEQ ID NO: 104)			
2987_H07 (SEQ ID NO: 105)	ATI-1310 (SEQ ID NO: 233) [нет]; ATI-1340 (SEQ ID NO: 233) [NEM]; ATI-1338 (SEQ ID NO: 233) [40k 2 вет]; ATI-1359 (SEQ ID NO: 233) [нет His, 40k 2 вет.]; ATI-1339 (SEQ ID NO: 233) [40k 4 вет]; ATI-1341 (SEQ ID NO: 233) [20k бис-ПЭГ]	PRD-1171[L2] (SEQ ID NO: 253); PRD-1173[L3] (SEQ ID NO: 254); PRD-1174[L4] (SEQ ID NO: 255)	PRD-1175[L1] (SEQ ID NO: 256); PRD-1177[L5] (SEQ ID NO: 257); PRD-1178[L6] (SEQ ID NO: 258); PRD-1180[L7] (SEQ ID NO: 259); PRD-1471[L8] (SEQ ID NO: 270)

Моно-аднектин^a	Цистеиновый мутант [модификация]^b	X-линкер-Fc^c	Fc-линкер-X^d
3006_A10 (SEQ ID NO: 106)			
3007_B08 (SEQ ID NO: 107)			
3007_C09 (SEQ ID NO: 108)			
3007_C10 (SEQ ID NO: 109)			
3008_A03 (SEQ ID NO: 110)			
3008_B08 (SEQ ID NO: 111)			
3008_D04 (SEQ ID NO: 112)			
3008_F01 (SEQ ID NO: 113)			
3008_G01 (SEQ ID NO: 114)			
3008_G03 (SEQ ID NO: 115)			
3115_D04 (SEQ ID NO: 116)	ATI-1375 (SEQ ID NO: 235) [40k 2 вст.]	PRD-1301[L2] (SEQ ID NO: 265)	PRD-1284[L5] (SEQ ID NO: 260)
3115_E06 (SEQ ID NO: 117)	ATI-1376 (SEQ ID NO: 236) [40k 2 вст.]	PRD-1302[L2] (SEQ ID NO: 266)	PRD-1285[L5] (SEQ ID NO: 261); PRD-1472[L8] (SEQ ID NO: 271)

Моно-аднектин^a	Цистеиновый мутант [модификация]^b	X-линкер-Fc^c	Fc-линкер-X^d
3116_A06 (SEQ ID NO: 118)	ATI-1379 (SEQ ID NO: 239) [40k 2 вст.]; ATI-1523 (SEQ ID NO: 239) [NEM]	PRD-1305[L2] (SEQ ID NO: 269)	PRD-1288[L5] (SEQ ID NO: 264); PRD-1474[L8] (SEQ ID NO: 273)
3116_A07 (SEQ ID NO: 119)	ATI-1377 (SEQ ID NO: 237) [40k 2 вст.]	PRD-1303[L2] (SEQ ID NO: 267)	PRD-1286[L5] (SEQ ID NO: 262); PRD-1473[L8] (SEQ ID NO: 272)
3116_C01 (SEQ ID NO: 120)			
3116_C06 (SEQ ID NO: 121)			
3116_H06 (SEQ ID NO: 122)			
3146_A08 (SEQ ID NO: 123)	ATI-1378 (SEQ ID NO: 238) [40k 2 вст.]	PRD-1304[L2] (SEQ ID NO: 268)	PRD-1287[L5] (SEQ ID NO: 263)

^aНемодифицированные моноаднектины содержат сердцевинную последовательность аднектина с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) и последующим C-концевым хвостом (EIDKPSQHNNHHH; SEQ ID NO: 325), как показано в таблице 2. Сердцевинная последовательность аднектина соответствует последовательности моноаднектина без N-концевого удлинения и C-концевой хвостовой последовательности.

^bАднектины с цистеиновыми мутантами содержат сердцевинную аднектиновую последовательность моноаднектина в первом столбце и предшествующую N-концевую последовательность удлинения (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) и последующий C-концевой хвост (GSGC[модификация]NNHHHH; SEQ ID NO: 326 или EGSGC[Модификация]NNHHHH; SEQ ID NO: 327), как показано в таблице 5.

^cАднектины с Fc фрагментом на C-конце содержат сердцевинную аднектиновую последовательность моноаднектина в первом столбце с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) и последующим C-

концевым хвостом (EI), за которым следует линкерная последовательность (таблица 4) и последовательность Fc области, как описано в таблице 6.

^dАднектины с Fc фрагментом на N-конце содержат последовательности области Fc с предшествующей N-концевой шарнирной последовательностью и последующим линкером (таблица 4) и сердцевинной аднектиновой последовательностью моноаднектина в первом столбце с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) и последующим C-концевым хвостом (EI), как показано в таблице 6.

SEQ ID NO иллюстративных линкеров согласно настоящему изобретению представлены в таблице 4.

Таблица 4

SEQ ID NO.	ЛИНКЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
181	L1	GAGGGGSG
182	L2	EPKSSD
---	L3	D
183	L4	ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA
184	L5	ELQLEESAAEAQDGELD
185	L6	GQPDEPGGS
186	L7	GGSGSGSGSGSGS
187	L8	ELQLEESAAEAQEGELE
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ЛИНКЕРЫ		
188	L9	GSGSG
189	L10	GSGC
190	L11	AGGGGSG
191	L12	GSGS
192	L13	QPDEPGGS
193	L14	GSGSGS
194	L15	TVAAPS
195	L16	KAGGGGSG
196	L17	KGSGSGSGSGSGS
197	L18	KQPDEPGGS
198	L19	KELQLEESAAEAQDGELD
199	L20	KTVAAPS
200	L21	KAGGGGSGG

SEQ ID NO.	ЛИНКЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
201	L22	KGSGSGSGSGSGSG
202	L23	KQPDEPGGSG
203	L24	KELQLEESAAEAQDGELDG
204	L25	KTVAAPSG
205	L26	AGGGGSGG
206	L27	AGGGGSG
207	L28	GSGSGSGSGSGSG
208	L29	QPDEPGGSG
209	L30	TVAAPSG
210	L31	PSTSTST
211	L32	EIDKPSQ
212	L33	GSGSGSGS
213	L34	GSGSGSGSGS
214	L35	GSGSGSGSGSGS
215	L36	GSGSGSGSGSGSGS
216	L37	GGSGSGSGSGSGS
217	L38	GGSGSGSGSGSGSGSG
218	L39	GSEGSEGSEGSEGSE
219	L40	GGSEGGSE
220	L41	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
221	L42	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
222	L43	GGGGSGGGGSGGGGSG
223	L44	GPGPGPG
224	L45	GPGPGPGPGPG
---	L46	GPG
225	L47	PAPAPA
226	L48	PAPAPAPAPAPA
227	L49	PAPAPAPAPAPAPAPAPA

SEQ ID NO иллюстративных пегилированных антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению представлены в таблице 5.

Таблица 5

Пегилированные антимиостатиновые аднектины
--

		Последовательность	
Клон		Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТИ-1106 ПЭГ с ветвями]	[40К с 2-мя	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WVSPRGRARYYRITYGETGGNS PVQEFTVPGRGSTATISGLKPGV DYTITVYAVTIYRDGMSHHDPISI NYRTGSGC[модификация]HHHH HH (SEQ ID NO: 228)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGT CGTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTACCGTGACGGTATGTCTCATCAT GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGG TAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC (SEQ ID NO: 240)
АТИ-1107 ПЭГ с ветвями]	[40К с 2-мя	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WSLPHAGHVNYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTLTKSQMIHYMPI SINYRTGSGC[модификация]HHH HHH (SEQ ID NO: 229)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCT GGTCATGTGAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTCTGACTAAATCTCAGATGATCCA TTACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC AC (SEQ ID NO: 241)
АТИ-1266 ПЭГ с ветвями] АТИ-1267 этилмалеимид]	[40К с 2-мя [N- этилмалеимид]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WTLPHAGRAHYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTTTSVILYKPIS INYTEGSGC[модификация]HHH HHH (SEQ ID NO: 230)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCT GGTCGTGCGCACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTGACGACAACCTTCGGTGATCCT TTACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC CATCAC (SEQ ID NO: 242)

Пегилированные антимиостатиновые аднектины		
	Последовательность	
Клон	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТИ-1275 [N-этилмаленимид] АТИ-1276 [40К ПЭГ с 2-мя ветвями]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLNIS WYLPYPAHMNYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGLTATISGLKPG VDYTITVYAVTLTKSQLHHRPIS INYRTEGSGC[модификация]HHH HHH (SEQ ID NO: 231)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT GCGCATATGAACTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCT GACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACCTCTGACAAAATCTCAGATTCTCCA TCATAGGCCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC CATCAC (SEQ ID NO: 243)
АТИ-1277 [N-этилмаленимид] АТИ-1278 [40К ПЭГ с 2-мя ветвями]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLNIS WSLPYAGHLNYYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVATISGLKPG VDYTITVYAVTLTKSQLHYMPI SINYRTEGSGC[модификация]HH HHHH (SEQ ID NO: 232)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTTCCTTATGCTG GTCATCTAACTATTACCGCATCACTTAC GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTG ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACATT ACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA GAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCA TCAC (SEQ ID NO: 244)

Пегилированные антимиостатиновые аднектины		
	Последовательность	
Клон	Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТИ-1310 [свободный Cys] АТИ-1338 [40К ПЭГ с 2-мя ветвями] АТИ-1339 [40К ПЭГ с 4-мя ветвями] АТИ-1340 [N- этилмалеимид] АТИ-1341 [20К бис- ПЭГ]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WTLPHAGRAHYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPI SINYRTEGSGC[модификация]NH HHHH (SEQ ID NO: 233)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCGTTACCACCACCAAAGTGATTCATTA TAAACCGATTTCCATTAATTACCGCACAG AAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCAT CAC (SEQ ID NO: 245)
АТИ-1359 [40К ПЭГ с 2-мя ветвями]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WTLPHAGRAHYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPI SINYRTEGSGC[модификация]NH HHHH (SEQ ID NO: 234)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA GGTTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTTGGTGTTA CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT ACCGTTACCACCACCAAAGTGATTCATTA TAAACCGATTTCCATTAATTACCGAACAG AAGGTAGCGGTTGC (SEQ ID NO: 246)

Пегилированные антимиостатиновые аднектины			
		Последовательность	
Клон		Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТІ-1375	[40К	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT
ПЭГ	с	WDAPRGLARYYRITYGETGGNS	GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC
ветвями]	2-мя	PVQEFTVFGRGTTATISGLKPGV	TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGT
		DYTITVYAVTIDRDGTRSFDPISI	CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG
		NYRTEGSGC[модификация]HHH	CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG
		HHH (SEQ ID NO: 235)	GAGTTCACTGTGTTTCGGTCGTGGTACCAC
			AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG
			TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA
			CTATCGACCGTGACGGTACCCGCAGCTTC
			GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA
			AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC
			AC (SEQ ID NO: 247)
АТІ-1376	[40К	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT
ПЭГ	с	WDAPAGLARYYRITYGETGGNS	GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC
ветвями]	2-мя	PVQEFTVVGRGNTATISGLKPGV	TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT
		DYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISI	CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG
		NYRTEGSGC[модификация]HHH	CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG
		HHH (SEQ ID NO: 236)	GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC
			AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG
			TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA
			CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG
			GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA
			AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC
			AC (SEQ ID NO: 248)

Пегилированные антимиостатиновые аднектины			
		Последовательность	
Клон		Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТI-1377 ПЭГ с 2-мя ветвями]	[40К	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WDAPKGLARYYRITYGETGGNS PVQEFTVVGRGNTATISGLKPGV DYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISI NYRTEGSGC[модификация]HHH HHH (SEQ ID NO: 237)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGT CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC AC (SEQ ID NO: 249)
АТI-1378 ПЭГ с 2-мя ветвями]	[40К	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS WSLPNPGNAHYRITYGETGGN SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG VDYTITVYAVTVTDTFITYKPIS INRTEGSGC[модификация]HHH HHH (SEQ ID NO: 238)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCG GGTAACGCCCATTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT GTCACTGTTACTGACACAGGTTTCATCAC GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC CATCAC (SEQ ID NO: 250)

Пегилированные антимиостатиновые аднектины			
		Последовательность	
Клон		Аминокислотная последовательность	Последовательность нуклеиновой кислоты
АТИ-1379 [40K ПЭГ с 2-мя ветвями]		MGVSDVPRDLEVVAATPTSLNIS	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT
АТИ-1523 [N-этилмаленимид]		WSLPHQGKANYYRITYGETGGN	GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC
		SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG	TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAA
		VDYTITVYAVTVTDTGYLKYKPI	GGTAAAGCCAATTATTACCGCATCACTTA
		SINYRTEGSGC[модификация]HH	CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC
		HHHH (SEQ ID NO: 239)	CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCTGTGGTGT
			TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG
			GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT
			GTCACCTGTTACTGATACAGGGTACCTCAA
			GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA
			CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC
			CATCAC (SEQ ID NO: 251)

SEQ ID NO иллюстративных Fc-слитых антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению представлены в таблице 6.

Таблица 6

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
		Последовательность			
Клон	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
PRD-932	EPKSSGSTHTCPP CPAPELLGGSSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVK	EPKSSGSTHTC PPCPAPELLGG SSVFLFPPKPK DTLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPAP IEKTISKAKGQ PREPQVYTLPP	GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWSL PYAGHLNYYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTLTKSQLIH YMPISINYRTEI (SEQ ID NO: 282)	GAGCCCAAATCTAGCGG GTCGACTCACACATGCC ACCGTGCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGAAGC TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRW QQGNVFSCSV HEALHNHYTK SLSLSPGAGGGG SGGVSDVPRDLE VVAATPTSLIS WSLPYAGHLNY YRITYGETGGNS PVQEFTVPGRGV TATISGLKPGVD YTITVYAVTLTK SQLIHYMPISINY RTEI (SEQ ID NO: 252)	SRDELTKNQVS LTCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTPP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSP (SEQ ID NO: 274)			CGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGCGCCG GAGGCGGCGGATCCGGT GGAGTTTCTGATGTGCCG CGCGACCTGGAAGTGGT TGCTGCCACCCCCACCAG CCTGCTGATCAGCTGGTC TCTTCCTTATGCTGGTCA TCTAAACTATTACCGCAT CACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCT GGTCGTGGTGTGACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTCTGACTAAGTCTCA GCTGATACATTACATGCC AATTTCATTAATTACCG GACCGAAATC (SEQ ID NO: 284)
PRD - 1171	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWT PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEIEP KSSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 253)	GVSDVPRDLE VVAATPTSLI SWTLPHAGRA HYRITYGETG GNSPVQEFTVP GRGVATISGL KPGVDYTITVY AVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTPPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCTCCTGGA CACTGCCCTCACGCTGGCC GGGCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGACA GGCGGGAACCTCTCCCGT GCAGGAATTCACCGTGC CTGGAAGGGGCGTGACT GCCACCATCAGTGGGCT GAAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTACG CTGTGACTGTGACCACAA CTAAAGTGATCCACTACA AACCCTATCTCTATTAATT ATCGGACCGAAATTGAG CCTAAGAGCTCCGACAA AACCACACATGCCCAC CTTGTCAGCCCCGAAC TGCTGGGCGGCCCTTCAG TCTTCTCTCCCCCCTCA AACCCTAAGGACACCTC ATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAAC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					AGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCCTCCTG CACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAAAC TACAAGACCACGCCTCCC GTGTTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCCGGAAAA (SEQ ID NO: 285)
PRD - 1173	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEID KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPE	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWTLPHAGRA HYRITYGETG GNSPVQEFTVP GRGVTATISGL KPGVDYTITVY AVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	D	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCTCCTGGA CACTGCCTCACGCTGGCC GGGCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGACA GGCGGGAACCTCTCCCGT GCAGGAATTCACCGTGC CTGGAAGGGGCGTGACT GCCACCATCAGTGGGCT

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	VTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCVMHEALH NYHTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 254)			ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GAAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTACG CTGTGACTGTGACCACAA CTAAAGTGATCCACTACA AACCCATCTCTATTAATT ATCGGACCGAAATTGAC AAGACCCACACATGCCC ACCTTGTCAGCCCCCGA GCTGCTGGGCGGCCCTTC AGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTG

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGAAA (SEQ ID NO: 286)
PRD - 1174	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEIES PKAQASSVPTAQ PQAEGLAKTHTC PPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIE KTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRW QQGNVFSCSV HEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 255)	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWTLPHAGRA HYYRITYGETG GNSPVQEFTVP GRGVATISGL KPGVDYTITVY AVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	ESPKAQASS VPTAQPPA EGLA (SEQ ID NO: 183)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCTCCTGGA CACTGCCCTCACGCTGGCC GGGCTCATTACTATAGAA TTACCTACGGGGAGACA GGCGGGAACCTCTCCCGT GCAGGAATTCACCGTGC CTGGAAGGGGCGTGACT GCCACCATCAGTGGGCT GAAGCCAGGAGTGGACT ACACAATTACCGTGTACG CTGTGACTGTGACCACAA CTAAAGTGATCCACTACA AACCCTATCTCTATTAATT ATCGGACCGAAATTGAG TCTCCAAAGGCTCAGGCC AGCTCCGTGCCTACCGCT CAGCCACAGGCTGAGGG CCTGGCTAAGACCCACA CATGCCCCCTTGTCAG CTCCCGAACTGCTGGGCG GGCCTTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGG

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					AGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAA (SEQ ID NO: 287)
PRD - 1175	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLT VLVH QDWL	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS	GAGGGGSG (SEQ ID NO: 181)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI	GACAAAAC TACACATG CCCACCGTGCCCAGCACC TGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCAATGC GTGGTGGTGGACGTGAG

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GAGGGGSGGVS DVPRDLEVVAAT PTSLLISWTLPHA GRAHYRITYGE TGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGL KPGVDYTITVYA VTVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO: 256)	VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)		(SEQ ID NO: 275)	CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACC ACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGG CGCCGGAGGCGGCGGAT CCGGTGGCGTGTCCGAC GTGCCCCGGGATCTAGA AGTGGTGGCTGCTACCCC CACAAGCTTGCTGATCTC CTGGACACTGCCTCACGC TGGCCGGGCTCATTACTA TAGAATTACCTACGGGG

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					AGACAGGCGGGAACCTCT CCCGTGCAGGAATTCACC GTGCCTGGAAGGGGCGT GACTGCCACCATCAGTG GGCTGAAGCCAGGAGTG GACTACACAATTACCGTG TACGCTGTGACTGTGACC ACAACTAAAGTGATCCA CTACAAACCCATCTCTAT TAATTATCGGACCGAAAT C (SEQ ID NO: 288)
PRD - 1177	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWTLPHAGRA HYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPG VDYTITVYAVTV	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTCCCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	TTTKVIHYKPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 257)				ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAAC TACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAATT ACCTACGGGGAGACAGG CGGGAAC TCTCCCGTGCA GGAATTCACCGTGCTGG AAGGGGCGTGACTGCCA CCATCAGTGGGCTGAAG CCAGGAGTGGACTACAC AATTACCGTGTACGCTGT GACTGTGACCACAAC TA AAGTGATCCACTACAAA CCCATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 289)
PRD - 1178	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV	GQPDEPGG S (SEQ ID NO: 185)	GVSDVPRDLEV V AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGV TATIS GLKPGVDYTITV	GACAAAAC TCAACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAAC TCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GQPDEPGSGSVS DVPRDLEVVAAT PTSLLISWTLPHA GRAHYRITYGE TGGNSPVQEFTV PGRGVTATISGL KPGVDYTITVYA VTVTTTKVIHYK PISINYRTEI (SEQ ID NO: 258)	HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)		YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCGTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGG CCAGCCCCGACGAGCCTG GCGGGAGCGGCGTGAGC GACGTGCCACGGGATCT AGAAGTGGTGGCTGCTA CCCCCACAAGCTTGCTGA TCTCCTGGACACTGCCTC

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					ACGCTGGCCGGGCTCATT ACTATAGAATTACCTACG GGGAGACAGGCGGGAAC TCTCCCGTGCAGGAATTC ACCGTGCCTGGAAGGGG CGTGACTGCCACCATCAG TGGGCTGAAGCCAGGAG TGGACTACACAATTACCG TGACGCTGTGACTGTGA CCACAATAAGTGATC CACTACAAACCCATCTCT ATTAATTATCGGACCGAA ATT (SEQ ID NO: 290)
PRD - 1180	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSH DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP GGSGSGSGSGSG SGVSDVPRDLEV VAATPTSLISW TLPHAGRAHY RITYGETGGNSP VQEFTVPGRGVT	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	GGSGSGSG SGSGS (SEQ ID NO: 186)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYITIV YAVTVTTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	ATISGLKPGVDY TITVYAVTVTTT KVINYKPISINYR TEI (SEQ ID NO: 259)				CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGG CGGCAGCGGGTCTGGAT CTGGCAGTGGGAGCGGC TCTGGCGTGAGCGACGT GCCACGGGATCTAGAAG TGGTGGCTGCTACCCCCA CAAGCTTGCTGATCTCCT GGACACTGCCTCACGCTG GCCGGGCTCATTACTATA GAATTACCTACGGGGAG ACAGGCGGGAACCTCTCC CGTGCAGGAATTCACCGT GCCTGGAAGGGGCGTGA CTGCCACCATCAGTGGGC TGAAGCCAGGAGTGGAC TACACAATTACCGTGTAC GCTGTGACTGTGACCACA ACTAAAGTGATCCACTAC AAACCCATCTCTATTAAT TATCGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 291)
PRD - 1284	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHE	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWDA PRGLARYYRITY GETGGNSPVQEF	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC

Fc-слитые антимимотиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWDAPRGLAR YYRITYGETGGN SPVQEFTVFGRG TTATISGLKPGV DYTITVYAVTID RDGTRSFDPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 260)	DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)		TVFGRGTTATISG LKPGVDYITITVY AVTIDRDGTRSF DPISINYRTEI (SEQ ID NO: 277)	CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGAGAGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGG AGTTCACTGTGTTCGGTC GTGGTACCACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT ATCGACCGTGACGGTAC CCGCAGCTTCGACCCAAT TTCCATTAATTACCGGAC CGAAATT (SEQ ID NO: 292)
PRD - 1285	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO:	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWDA PAGLARYYRITY GETGGNSPVQEF TVVGRGNTATIS GLKPGVDYTITV YAVTIFRDGPVT WDPI SIN YRTEI (SEQ ID NO: 278)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	LISWDAPAGLAR YYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRG NTATISGLKPGV DYTITVYAVTIFR DGPVTWDPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 261)	276)			GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGG AGTTCAGTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT ATCTTCCGTGACGGTCCC GTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 293)

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
PRD - 1286	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWDAPKGLAR YYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRG NTATISGLKPGV DYTITVYAVTIFR DGPVTWDPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 262)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWDA PKGLARYRITY GETGGNSPVQEF TVVGRGNTATIS GLKPGVDYTITV YAVTIFRDGPVT WDPIINRYRTEI (SEQ ID NO: 279)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGAAGGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGG AGTTCAGTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT ATCTTCCGTGACGGTCCC GTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 294)
PRD - 1287	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWSL PNPGNAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTDGTFIT YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 280)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWSLPNPGNA HYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPG VDYTITVYAVTV TDTGFITYKPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 263)	DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)			AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCGAATCCGGGTAA CGCCCATATTACCGCAT CACTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCT GGTCGTGGTGTTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTGTTACTGACACAGG TTTCATCACGTACAAACC

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					AATTTCCATTAATTACCG GACCGAAATT (SEQ ID NO: 295)
PRD - 1288	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ DGELDGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWSLPHQGKA NYYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPG VDYTITVYAVTV TDTGYLKYKPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 264)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQDGELD (SEQ ID NO: 184)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWSL PHQKANYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTDTGYLK YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 281)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCAGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCGTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GACGGAGAACTGGATGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCGCACCAAGGTAA AGCCAATTATTACCGCAT CACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCT GGTCTGGTGTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTGTTACTGATACAGG GTACCTCAAGTACAAAC CAATTTCCATTAATTACC GGACCGAAATT (SEQ ID NO: 296)
PRD - 1301	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWD APRGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVFGRGTTATIS GLKPGVDYTITV YAVTIDRDGTRS FDPISINYRTEIEP KSSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWDAPRGLAR YYRITYGETGG NSPVQEFTVFG RGTATISGLK PGVDYTITVYA VTIDRDGTRSF DPISINYRTEI (SEQ ID NO: 277)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCAGCTGGG ACGCTCCGAGAGGTCTG GCTCGATATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGTTCCG GTCGTGGTACCACAGCTA CCATCAGCGGCCTTAAAC CTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCA

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKT SKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVME ALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 265)			WESNGQPENNY KTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	CTATCGACCGTGACGGTA CCCGCAGCTTCGACCCAA TTTCCATTAATTACCGGA CCGAAATTGAGCCTAAG AGCTCCGACAAAACCCA CACATGCCACCTTGTC AGCCCCCGAACTGCTGG GCGGCCCTTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCCA AGGACACCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGTT GGACTCCGACGGCTCCTT CTTCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAAC

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCC CGGGAAA (SEQ ID NO: 297)
PRD - 1302	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWD APAGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYTIT VYAVTIFRDGPV TWDPI SINYTEI EPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIE KTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVM HEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 266)	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWDAPAGLAR YYRITYGETGG NSPVQEFTVVG RGNTATISGLK PGVDYTITVYA VTIFRDGPVTW DPISINYTEI (SEQ ID NO: 278)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCAGCTGGG ACGCTCCGGCTGGTCTGG CTCGATATTACCGCATCA CTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCA GGAGTTCACTGTGGTCGG TCGTGGTAACACAGCTAC CATCAGCGGCCTTAAACC TGGCGTTGATTATACCAT CACTGTGTATGCTGTAC TATCTTCCGTGACGGTCC CGTCACCTGGGACCCAAT TTCCATTAATTACCGGAC CGAAATTGAGCCTAAGA GCTCCGACAAAACCCAC ACATGCCACCTTGTCCA GCCCCGAACGTCTGGG CGGCCCTTCACTCTTCCT CTCCCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					TCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGA CCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAA (SEQ ID NO: 298)
PRD - 1303	GVSDVPRDLEVV AATPTSLLISWD APKGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYTIT VYAVTIFRDGPV TWDPI SIN YRTEI EPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWDAPKGLAR YYRITYGETGG NSPVQEFTVVG RGNTATISGLK PGVDYTITVYA VTIFRDGPVTW DPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 279)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCAGCTGGG ACGCTCCGAAGGGTCTG GCTCGATATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGG AGGCAATAGCCCTGTCC AGGAGTTCACTGTGGTCG GTCGTGGTAACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATAC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLH QDWLNKEYKC KVS NKALPAPIE KTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVM HEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 267)			VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	CATCACTGTGTATGCTGT CACTATCTTCCGTGACGG TCCCGTCACCTGGGACCC AATTTCATTAATTACCG GACCGAAATTGAGCCTA AGAGCTCCGACAAAACC CACACATGCCACCTTGT CCAGCCCCCGAACTGCTG GGCGGCCCTTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAATAACA AGACCACGCCTCCCGTGT TGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					AGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGAAA (SEQ ID NO: 299)
PRD - 1304	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWSL PNPGNAHYIRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTDTGFI YKPISINYRTEIEP KSSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESN GQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 268)	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWSLPNPGNA HYIRITYGETG GNSPVQEFTVP GRGVATISGL KPGVDYTITVY AVTVTDTGFI YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 280)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPPEVT CVVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTPPVLDSGDSF FLYSLKTVLDSKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCAGCTGGT CTCTGCCGAATCCGGGTA ACGCCCATTATTACCGCA TCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGT CCAGGAGTTCAGTGCC TGGTCGTGGTGTTACAGC TACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTGTACTGACACAGG TTTCATCACGTACAAACC AATTTCATTAATTACCG GACCGAAATTGAGCCTA AGAGCTCCGACAAAACC CACACATGCCACCTTGT CCAGCCCCCGAACTGCTG GGCGGCCCTTCAGTCTTC CTCTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCAC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACA AGACCACGCCTCCCGTGT TGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGAAA (SEQ ID NO: 300)
PRD - 1305	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWSL PHQGKANYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTDTGYL KYKPISINYRTEI EPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL	GVSDVPRDLE VVAATPTSLLI SWSLPHQGKA NYYRITYGETG GNSPVQEFTVP GRGVTATISGL KPGVDYTITVY AVTVTDTGYL KYKPISINYRTE I (SEQ ID NO: 281)	EPKSSD (SEQ ID NO: 182)	KTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRD	GGCGTGAGCGACGTGCC CCGGGATCTAGAAGTGG TGGCTGCTACCCCCACAA GCTTGCTGATCAGCTGGT CTCTGCCGCACCAAGGTA AAGCCAATTATTACCGCA TCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGT CCAGGAGTTCACTGTGCC TGGTCGTGGTGTTACAGC TACCATCAGCGGCCTTAA

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIE KTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFLL YSKLTVDKSRW QQGNVFSCSV HEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 269)			ELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVE WESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 283)	ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTGTTACTGATACAGG GTACCTCAAGTACAAAC CAATTTCCATTAATTACC GGACCGAAATTGAGCCT AAGAGCTCCGACAAAAC CCACACATGCCCACCTTG TCCAGCCCCCGAACTGCT GGGCGGCCCTTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACA AGACCACGCCTCCCGTGT TGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					TCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGAAA (SEQ ID NO: 301)
PRD - 1471	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFP KPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ EGELEGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWTLPHAGRA HYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPG VDYTITVYAVTV TTTKVIHYKPI NYRTEI (SEQ ID NO: 270)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWTL PHAGRAHYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS GLKPGVDYTITV YAVTVTTKVIH YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 275)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC ACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAGCCCTCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACC

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GAAGGAGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAATT ACCTACGGGGAGACAGG CGGGAACCTCTCCCGTGCA GGAATTCACCGTGCCTGG AAGGGGCGTGA CTGCCA CCATCAGTGGGCTGAAG CCAGGAGTGGACTACAC AATTACCGTGTACGCTGT GACTGTGACCACA ACTA AAGTGATCCACTACAAA CCCATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (SEQ ID NO: 302)
PRD - 1472	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS	ELQLEESAA EAQEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWDA PAGLARYYRITY GETGGNSPVQEF TVVGRGNTATIS GLKPGVDYTITV YAVTIFRDGPVT WDPISINYRTEI	GACAAA ACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACC TGA ACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ EGELEGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWDAPAGLAR YYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRG NTATISGLKPGV DYTITVYAVTIFR DGPVTWDPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 271)	VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)		(SEQ ID NO: 278)	CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GAAGGAGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGGTCTGGCT

Fc-слитые антимиостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGG AGTTCACTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT ATCTTCCGTGACGGTCCC GTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 303)
PRD - 1473	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHE DPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPV L DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ EGELEGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWDAPKGLAR YYRITYGETGGN SPVQEFTVVGRG NTATISGLKPGV	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)	ELQLEESAA EAQEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWDA PKGLARYYRITY GETGGNSPVQEF TVVGRGNTATIS GLKPGVDYTITV YAVTIFRDGPVT WDPISINYRTEI (SEQ ID NO: 279)	GACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTAACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	DYTITVYAVTIFR DGPVTWDPISIN YRTEI (SEQ ID NO: 272)				GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GAAGGAGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGAAGGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGG CAATAGCCCTGTCCAGG AGTTCACTGTGGTCGGTC GTGGTAACACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT ATCTTCCGTGACGGTCCC GTCACCTGGGACCCAATT TCCATTAATTACCGGACC GAAATT (SEQ ID NO: 304)
PRD - 1474	DKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTF EVTCTVVVDVSHE DPEVKFNWYVD	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF	ELQLEESAA EAQEGELE (SEQ ID NO: 187)	GVSDVPRDLEV AATPTSLISWSL PHQKANYRIT YGETGGNSPVQE FTVPGRGVTATIS	GACAAAACACACATG CCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGAC

Fc-слитые антимногостатиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
	GVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP ELQLEESAAEAQ EGELEGVSDVPR DLEVVAATPTSL LISWSLPHQGKA NYRITYGETGG NSPVQEFTVPGR GVTATISGLKPG VDYTITVYAVTV TDTGYLKYKPISI NYRTEI (SEQ ID NO: 273)	NWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD GSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO: 276)		GLKPGVDYTITV YAVTVTDTGYLK YKPISINYRTEI (SEQ ID NO: 281)	ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCC AAAAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGA GCTGCAGCTGGAGGAAA GCGCCGCTGAGGCTCAG GAAGGAGAACTGGAAGG CGTGAGCGACGTGCCAC GGGATCTAGAAGTGGTG

Fc-слитые антимимотиновые аднектины					
Клон	Последовательность				
	Аминокислотная последовательность	N-концевой домен	Линкер	C-концевой домен	Последовательность нуклеиновой кислоты
					GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCGCACCAAGGTAA AGCCAATTATTACCGCAT CACTTACGGCGAAACAG GAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGCCT GGTCGTGGTGTACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATAC CATCACTGTGTATGCTGT CACTGTTACTGATACAGG GTACCTCAAGTACAAAC CAATTTCCATTAATTACC GGACCGAAATT (SEQ ID NO: 305)

SEQ ID NO иллюстративных лидерных (N-концевое удлинение) и C-концевых хвостовых последовательностей согласно настоящему изобретению представлены в таблице 7.

Таблица 7

Сводная таблица иллюстративных последовательностей			
SEQ ID NO	Описание	Название	Последовательность
306	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT1	MGVSDVPRDL
307	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT2	GVSDVPRDL
308	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT3	VSDVPRDL
309	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT4	SDVPRDL
310	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT5	DVPRDL
311	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT6	VPRDL
312	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT7	PRDL
---	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT8	RDL

	последовательность		
---	Иллюстративная лидерная последовательность	AdNT9	DL
211	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT1	EIDKPSQ
---	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT2	EI
313	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT3	EIEPKSS
314	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT4	EIDKPC
315	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT5	EIDKP
316	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT6	EIDK
317	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT7	EIDKPS
318	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT8	EIEKPSQ
319	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT9	EIDKPSQLE
320	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT10	EIEDEDEDED
321	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT11	EGSGS
322	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT12	EIDKPCQ
189	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT13	GSGC
323	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT14	EGSGC
324	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT15	EIDKPCQLE
325	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT16	EIDKPSQNNNNNN
326	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT17	GSGCHNNNNN
327	Иллюстративная хвостовая последовательность	AdCT18	EGSGCHNNNNN
328	Метка	T1	NNNNNN

IV. Технология слияния нуклеиновых кислот-белков

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен аднектин, содержащий домены фибронектина типа III, который связывается с миостатином. Один из способов быстро получить и проверить домены Fn3 со специфическими связывающими свойствами представляет собой технологию слияния нуклеиновых кислот-белков Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company. В настоящем раскрытии используется технология экспрессии и мечения *in vitro*, называемая "PROfusion", которая применяет слияния нуклеиновых кислот-белков (слияния РНК- и ДНК-белков), чтобы идентифицировать новые полипептиды и мотивы аминокислот, которые важны для связывания с белками. Технология слияния нуклеиновых кислот-

белков представляет собой технологию, которая ковалентно образует пары белка с его кодирующей генетической информацией. Для более подробного описания технологии слияния РНК-белок и способов скрининга библиотеки основанных на фибронектине каркасных белков смотрите Szostak et al., U.S. Pat. Nos. 6,258,558, 6,261,804, 6,214,553, 6,281,344, 6,207,446, 6,518,018 and 6,818,418; Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997;94:12297-12302 и Kurz et al., *Molecules*, 2000;5:1259-64, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

V. Векторы и полинуклеотиды

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из описанных в настоящем документе различных белков или полипептидов, могут быть синтезированы химически. Использование кодонов может быть выбрано таким образом, чтобы повысить экспрессию в клетке. Такое использование кодонов будет зависеть от выбранного типа клеток. Паттерны использования специализированных кодонов были разработаны для *E. coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, клеток растений, клеток дрожжей и клеток насекомых. Смотрите, 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 (October 2002); Connell, N.D., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(5):446-449 (October 2001); Makrides et al., *Microbiol. Rev.*, 60(3):512-538 (September 1996) и Sharp et al., *Yeast*, 7(7):657-678 (October 1991).

Общие техники для манипуляции с нуклеиновыми кислотами описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Vols. 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 обновлениях, включенных в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, ДНК, кодирующая полипептид, функционально связана с подходящими регуляторными элементами транскрипции или трансляции, полученными из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают в себя промотор транскрипции, необязательную последовательность оператора для управления транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящий рибосомальный сайт связывания мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Способность к репликации в хозяине, как правило, предоставляемая сайтом инициации репликации, и ген селекции для облегчения распознавания трансформантов включены дополнительно.

Описанные в настоящем документе белки могут быть получены рекомбинантно не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, содержащий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбранная гетерологичная сигнальная последовательность представляет собой ту, которая распознается и обрабатывается (например, расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Иллюстративная N-концевая лидерная последовательность для производства полипептидов в системе млекопитающих представляет собой: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 177), которая удаляется с помощью последующей экспрессии клетки-хозяина.

Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают нативную сигнальную последовательность, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы лидеров в виде щелочной фосфатазы, пенициллиназы, 1 пр или термостабильного энтеротоксина II.

Для дрожжевой секреции нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, дрожжевым инвертазным лидером, лидером фактора (включая в себя лидеры альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидером-кислотной фосфатазой, лидером-глюкоамилазой *S. Albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в патенте США № 5631144. В клеточной экспрессии млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD простого герпеса. ДНК для таких областей-предшественников может быть лигирована в рамку считывания с ДНК, кодирующей белок.

Векторы как экспрессии, так и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в векторах клонирования эта последовательность представляет собой ту, которая дает возможность вектору реплицироваться независимо хромосомную ДНК хозяина, и включает в себя точку ориджин или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, ориджин плазмиды размером 2 микрона подходит для дрожжей, и

различные вирусные ориджины (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Вообще, ориджин компонента репликации не нужен для экспрессирующих векторов млекопитающих (ориджин SV40 можно, как правило, использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген селекции, также называемый селектируемый маркер. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или трациклину, (б) дополняют ауксотрофные дефициты или (с) снабжают необходимыми питательными веществами, недоступными из сложных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для бацилл.

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок согласно настоящему изобретению, например, основанный на фибронектине каркасный белок. Промоторы, пригодные для использования в прокариотических хозяевах, включают в себя промотор *rhoA*, бета-лактамазу и лактозные промоторные системы, щелочную фосфатазу, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как промотор *tan*. Тем не менее, подходят и другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей белок согласно настоящему изобретению. Известны промоторные последовательности для эукариот. Практически все эукариотические гены содержат АТ-богатую область, расположенную приблизительно на 25-30 оснований выше от сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, которая обнаружена на 70-80 оснований выше от начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может служить сигналом для добавления поли-А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности надлежащим образом вставлены в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в хозяевах-дрожжах включают в себя промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других

гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Транскрипцию из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих можно регулировать, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовирус (такой как аденовирус 2), бычий вирус папилломы, птичий вирус саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Транскрипция ДНК, кодирующей белок согласно настоящему изобретению, более высокими эукариотами часто увеличивается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Как правило, однако, используют один энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают в себя энхансер SV40 на поздней стороне сайта инициации репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне сайта инициации репликации и аденовирусные энхансеры. Смотрите также Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) об усиливающих элементах для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть встроен в вектор в положении 5' или 3' к кодирующей пептид последовательности, но предпочтительно расположен в сайте 5' от промотора.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядерных клетках от других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5' и, иногда, 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей белок согласно настоящему изобретению. Один из применимых компонентов терминации транскрипции представляет собой

область полиаденилирования бычьего гормона роста. Смотрите WO 94/11026 и раскрытый в нем экспрессирующий вектор.

Рекомбинантная ДНК может также включать в себя любой тип последовательности метки белка, которая может быть применима для очистки белка. Примеры белковых меток включают в себя без ограничения гистидиновую метку, метку FLAG, метку тус, метку HA и метку GST. Соответствующие векторы клонирования и экспрессии для использования вместе с бактериальной, грибковой, дрожжевой и млекопитающей клетками-хозяевами могут быть найдены в *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, New York (1985)), соответствующее раскрытие которой приведено в настоящем документе посредством ссылки.

Конструкт экспрессии вводят в клетку-хозяина с использованием способа, соответствующего клетке-хозяину, что будет очевидно специалисту в настоящей области техники. В настоящей области техники известны разнообразные способы для введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, включающие в себя без ограничения электропорацию; трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфекцию (где вектор представляет собой инфекционный патоген).

Подходящие клетки-хозяева включают в себя прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают в себя грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или *Bacillus* spp. Дрожжи, предпочтительно видов *Saccharomyces*, такие как *S. cerevisiae*, могут также быть использованы для производства полипептидов. Различные системы клеточных культур млекопитающих или насекомых могут быть также использованы для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для производства гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются в Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают в себя клеточные линии эндотелиальных клеток, клеток почек обезьяны COS-7, CV-1, L клеток, C127, 3T3, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток почек эмбриона человека, HeLa, 293, 293T и ВНК. Очищенные полипептиды получают путем культивирования подходящих систем хозяин/вектор для экспрессии рекомбинантных белков. Для многих применений небольшой размер многих описанных в настоящем документе полипептидов сделал бы экспрессию в *E.*

coli предпочтительным способом для экспрессии. Затем белок очищают от культуральной среды или клеточных экстрактов.

VI. Производство белка

Настоящее изобретение также направлено на клеточные линии, которые экспрессируют антимиостатиновый аднектин или его слитый полипептид. Создание и выделение клеточных линий, продуцирующих антимиостатиновый аднектин, может быть осуществлено с использованием стандартных техник, известных в настоящей области техники, такие как те, что описаны в настоящем документе.

Клетки-хозяева трансформируют с описанными в настоящем документе экспрессирующими или клонирующими векторами для производства белка и культивирования в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности. В показанных в настоящем документе примерах клетки-хозяева, используемые для высокоэффективного производства белка (HTPP) и производства средней эффективности, были из бактериального штамма HMS174-.

Аднектины согласно настоящему изобретению также могут быть получены в виде агликозилированной формы путем получения аднектинов, например, в прокариотических клетках (например, *E.coli*). Следует отметить, что агликозилированные формы аднектинов согласно настоящему изобретению обладают такой же аффинностью, активностью и механизмом действия, как гликозилированные аднектины при испытании *in vitro*.

Клетки-хозяева, используемые для получения белков согласно настоящему изобретению можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная эссенциальная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM), (Sigma)), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, многие из сред, описанные в Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), патенты США № 4767704, 4657866, 4927762, 4560655, 5122469, 6048728, 5672502 или патент США № RE 30985, могут быть использованы в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть дополнена при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как

аденозин и тимидин), антибиотиками (например, лекарственным средством гентамицином), микроэлементами (определенными 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 настоящей области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой те, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в настоящей области.

Описанные в настоящем документе белки могут также быть получены с использованием системы трансляции клетки. Для этих целей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, должны быть модифицированы, чтобы позволить транскрипцию *in vitro* для получения мРНК и позволить бесклеточную трансляцию мРНК в определенной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная система трансляции млекопитающих или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная система трансляции).

Белки согласно настоящему изобретению могут быть также получены путем химического синтеза (например, с помощью способов, описанных в Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Модификации белка также могут быть получены с помощью химического синтеза.

Белки согласно настоящему изобретению могут быть очищены с помощью способов выделения/очистки для белков, как правило, известных в области химии белков. Неограничивающие примеры включают в себя экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, с сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, гель фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки полипептиды могут быть обменены на различные буферы и/или сконцентрированы с помощью любого из разнообразных способов, известных в настоящей области техники, включающих в себя без ограничения фильтрование и диализ.

Очищенный полипептид представляет собой предпочтительно очищенный по меньшей мере на 85% или предпочтительно по меньшей мере на 95%, и наиболее

предпочтительно по меньшей мере на 98%. Независимо от точного числового значения чистоты полипептид представляет собой достаточно чистый для использования в качестве фармацевтического продукта.

VII. Биофизическая и биохимическая характеристика

Связывание антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению с молекулой-мишенью (например, миостатином) может быть оценено с точки зрения констант равновесия (например, диссоциации, K_D) и с точки зрения кинетических констант (например, скорости ассоциации, k_{on} , и скорости диссоциации, k_{off}). Аднектин, как правило, будет связываться с молекулой-мишенью с K_D , составляющей менее чем 500 нМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 200 пМ или 100 пМ, хотя более высокие значения K_D могут быть допустимы, когда k_{off} достаточно низка или k_{on} достаточно высока.

Анализ аффинности связывания in vitro

Антимиостатиновые аднектины, которые связываются с и противодействуют миостатину, могут быть определены с использованием различных анализов *in vitro*. Предпочтительно, анализы представляют собой высокоэффективные анализы, которые делают возможным скрининг нескольких кандидатных аднектинов одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления ВМР-11, который разделяет 90% аминокислотной идентичности с миостатином, может быть использован в качестве суррогата миостатина в анализах *in vitro*, когда анализ проводят в насыщающих условиях. Примечательно, что слитые с доменами Fc антимиостатиновые аднектины могут связываться как с миостатином, так и ВМР-11, в то время как моноаднектины связываются преимущественно с миостатином. Без ограничения какой-либо теорией это может отражать повышенную avidность двухвалентных слитых с Fc аднектинов, по сравнению с моновалентными аднектинами. Подобное усиленное связывание с ВМР11 наблюдается с двухвалентными пегилированными аднектинами, например, АТІ-1341, которые содержат аднектины, слитые с двух концов с фрагментами ПЭГ 20 кД.

Иллюстративные анализы для определения аффинности связывания антимиостатиновых аднектинов описаны в примерах ниже и включают в себя без ограничения жидкофазные способы, такие как анализ кинетического исключения (KinExA) (Blake et al., *JBC* 1996;271:27677-85; Drake et al., *Anal Biochem* 2004;328:35-43), поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с системой Biacore (Uppsala, Sweden) (Welford et al., *Opt. Quant. Elect* 1991;23:1; Morton and Myszka, *Methods in Enzymology*

1998;295:268) и анализы гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Newton et al., *J Biomol Screen* 2008;13:674-82; Patel et al., *Assay Drug Dev Technol* 2008;6:55-68).

Согласно некоторым вариантам осуществления биомолекулярные взаимодействия могут контролироваться в режиме реального времени с системой Biacore, которая использует SPR для обнаружения изменений в резонансном угле света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной подложке в связи с изменением показателя преломления поверхности до 300 нм. Анализ Biacore создает константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, константы равновесия диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают с помощью оценки констант скорости ассоциации и диссоциации с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируется для ковалентного связывания с мишенью. Мишень затем разбавляют и вводят по чипу, чтобы получить сигнал в единицах отклика иммобилизованного материала. Поскольку сигнал в резонансных единицах (RU) пропорционален массе иммобилизованного материала, это представляет собой спектр иммобилизованных концентраций мишени на матрице. Данные ассоциации и диссоциации подходят одновременно в глобальном анализе для решения выражения чистого коэффициента для бимолекулярного взаимодействия 1:1, получая наилучшим образом соответствующие значения для k_{on} , k_{off} и R_{max} (максимальный ответ при насыщении). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_D рассчитываются из измерений SPR, как k_{off}/k_{on} .

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обладают K_D в анализе аффинности SPR, описанном в примере 6, равной 500 нМ или менее, 400 нМ или менее, 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, 150 нМ или менее, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60 нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 15 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее или 1 нМ или менее. Предпочтительно, K_D составляет 15 нМ или менее. Более предпочтительно, K_D составляет 2,0 нМ или менее.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обладают IC_{50} в анализе HTRF, описанном в примере 4, равной 5 нМ или менее, 4 нМ или менее, 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, IC50 составляет 1,5 нМ или менее. Более предпочтительно, IC50 составляет 0,5 нМ или менее.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обладают K_D в анализе кинетического исключения, описанном в примере 7, равной 2 нМ или менее, 1,5 нМ или менее, 1 нМ или менее, 900 пМ или менее, 850 пМ или менее, 800 пМ или менее, 750 пМ или менее, 700 пМ или менее, 650 пМ или менее, 600 пМ или менее, 550 пМ или менее, 500 пМ или менее, 450 пМ или менее, 400 пМ или менее, 350 пМ или менее, 340 пМ или менее, 330 пМ или менее, 300 пМ или менее, 250 пМ или менее, 200 пМ или менее, 150 пМ или менее или 100 пМ или менее. Предпочтительно, K_D составляет 850 пМ или менее.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе выше анализы представляют собой иллюстративные и что любой известный в настоящей области техники способ определения аффинности связывания между белками (например, основанный на переносе флуоресценции (FRET), иммуноферментный анализ, а также анализы конкурентного связывания (например, радиоиммуноанализы)) может быть использован для оценки аффинности связывания антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению.

Анализы на активность антагониста in vitro

Способность антимиостатиновых аднектинов противодействовать активности миостатина может быть легко определена с использованием различных анализов *in vitro*. Предпочтительно, анализы представляют собой высокоэффективные анализы, которые позволяют скрининг нескольких кандидатных аднектинов одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления антагонистические эффекты антимиостатиновых аднектинов на миостатиновую активность могут быть определены в основанных на клетках реагирующих на активин элемент (ARE) - люциферазных репортерных анализах, как описано в примере 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению снижают индуцированную миостатином активность ARE-люциферазы по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более по отношению к контролю при совместной инкубации миостатина с антимиостатиновым аднектином до стимуляции клеток со смесью. Иллюстративная

контрольная реакция включает в себя обработку клеток только миостатином или миостатином, предварительно инкубированным с избытком эталонного ингибитора миостатина, таким как химера активина RIIb Fc человека (R&D Systems) или ActRIIb-Fc, как описано в Morrison et al. (*Experimental Neurology* 2009; 217:258-68). Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют репортерную активность ARE-люциферазы с IC50 равной 500 нМ или менее, 400 нМ или менее, 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ, 0,5 нМ или менее, 0,4 нМ или менее, 0,3 нМ или менее, 0,2 нМ или менее или 0,10 нМ или менее, как описано в примере 3.

Согласно другим вариантам осуществления антагонистические эффекты антимиостатиновых аднектинов на миостатиновую активность могут быть определены путем измерения степени фосфорилирования SMAD в обработанных миостатином клетках, как описано в примере 5. Согласно определенным вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению уменьшают индуцированное миостатином фосфорилирование SMAD по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% , по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 97% или более по отношению к контролю при совместной инкубации миостатина с антимиостатиновым аднектином до стимуляции клеток со смесью. Иллюстративная контрольная реакция включает в себя обработку клеток только с миостатином или миостатином, предварительно инкубированным с избытком эталонного ингибитора миостатина, таким как химера активина RIIb Fc человека (R&D Systems) или ActRIIb-Fc, как описано в Morrison et al. (*Experimental Neurology* 2009; 217:258-68). Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют фосфорилирование SMAD с IC50 равной 1 нМ или менее, 0,8 нМ или менее, 0,6 нМ или менее, 0,4 нМ или менее, 0,3 нМ или менее, 0,2 нМ или менее, 0,1 нМ или менее в 12-балльной или 4-балльной реакции ингибирования, как описано в примере 5. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению при 10 нМ ингибируют фосфорилирование SMAD миостатином по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по

меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 98% или более, как описано в примере 5.

Кроме того, известно несколько модельных систем *in vitro*, которые используют клетки, культуры тканей и гистологические способы для исследования заболеваний моторных нейронов. Например, органотипический срез спинного мозга крыс, подвергнутый глутаматной эксайтотоксичности, применим в качестве модельной системы для проверки эффективности антимиостатиновых аднектинов в предотвращении дегенерации двигательных нейронов. Corse et al., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6:335-346. Для обсуждения систем *in vitro* для использования в исследовании ALS смотрите, например, Bar, P. R., *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 405:285-295; Silani et al., *J. Neurol.* (2000) 247 Suppl 1:128-36; Martin et al., *Int. J. Mol. Med.* (2000) 5:3-13.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе анализы представляют собой иллюстративные и что любой известный в настоящей области техники способ, который может служить в качестве отсчета для миостатиновой активности, представляет собой подходящий для использования в исследовании миостатиновых антагонистических эффектов антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению (например, ПЦР в режиме реального времени мРНК генов-мишеней SMAD (например, Smad 7; Ciarmela et al., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011;96:755-65) или мРНК ARE-содержащих генов).

Модели in vivo

Существуют различные известные в настоящей области техники модели на животных, которые повторяют симптомы заболеваний, нарушений и состояний, связанных с атрофией мышц, связанных, например, с мышечными, нервно-мышечными, неврологическими и метаболическими нарушениями. Эти модели могут быть использованы для исследования эффективности антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению.

Например, не ограничивающие примеры таких животных моделей включают в себя, например, мышиную модель с X-хромосомной мышечной дистрофией (*mdx*) (US2011/0008375, Gehrig et al., *Nature* 2012;484:394-8), включая в себя 4 дополнительных штамма мыши *mdx* - мышь *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv*, or *mdx5cv* (Phelps et al., *Human Molecular Genetics*. 1996;5(8):1149-1153), мышь *mdx* с дополнительной абляцией дистрофинового гомолога атрофина (*mdx/utr^{-/-}*) (Deconinck et al., *Cell*. 1997;90(4):717-727), альфа-SG-нулевая C57BL/6 мышь (Duclos et al. (1998)

J. Cell Biol. 142, 1461-1471), и те, которые недавно рассмотрены в Nakamura et al., (*J Biomed Biotechnol.* 2011; Article ID No: 184393), например, мышь mdx52, в которой удаляется экзон 52 мышинового гена DMD, модель мышечной дистрофии Golden Retriever (GRMD), модель X-хромосомной мышечной дистрофии собак (CXMDJ) и модель гипертрофической кошачьей мышечной дистрофии (HFMD) (например, Shelton et al., *Neuromuscular Disorders.* 2005;15(2):127–138).

Животные модели для изучения нарушений мотонейронов, таких как ALS, представляют собой трансгенных мышей с ALS-связанным мутантным геном Cu/Zn супероксиддисмутазы (SOD1) (mSOD1G93A и/или mSOD1G37R). Эти мыши развивают доминантно наследуемое паралитическое нарушение во взрослом возрасте со многими клиническими и патологическими особенностями семейного ALS. (Например, Gurney et al., *Science* (1994) 264:1772 1775; Nagano et al., *Life Sci* (2002) 72:541 548). Другие животные модели включают в себя две встречающиеся в природе мышинные модели для прогрессивной двигательной нейропатии (pmn) и нестабильности шейного отдела позвоночника (воблер-синдром) (Haeggeli and Kato, *Neurosci. Lett.* (2002) 335:39 43). Для обзора различных животных моделей для использования в изучении мотонейронных заболеваний, таких как ALS, смотрите, например, Jankowsky et al., *Curr Neurol Neurosci. Rep.* (2002) 2:457 464; Elliott, J. L., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6:310 20; and Borchelt et al., *Brain Pathol.* (1998) 8:735 757.

Животные модели других нейродегенеративных или нейропатологических заболеваний в дополнение к ALS включают в себя модели трансгенных мышей для оценки спинной и бульбарной мышечной атрофии (SBMA) (Katsuno et al., *Neuron* (2002) 35:843 854), животные модели для паралитического полиомиелита человека (Ford et al., *Microb. Pathog.* (2002) 33:97 107), животные модели спинальной мышечной атрофии (Schmid et al., *J. Child Neurol.* 22, 1004-1012, 2007), животные модели для дистальной миопатии и наследственной миопатии с включениями (Malicdan et al., *Acta Myol.* 2007 December; 26(3): 171–175), мышинной модели генетического демиелинизирующего заболевания (Suzuki et al., *Microsc. Res. Tech.* 1995;32:204–214) и те, которые описаны в Meyer ZuHörste et al. (*Curr. Opin. Neurol.* 2006;19:464–473).

Животные модели для исследования эффективности антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению по отношению к потере мышечного объема вследствие атрофии и/или бездействия, включают в себя без ограничения мышинные модели односторонней иммобилизации (Madaro et al., *Basic Applied Myology* 2008;18:149-153), разрыва ахиллового сухожилия (тенотомия) (Bialek et al., *Physiol*

Genomics 2011;43:1075-86) и те, которые раскрыты в Powers et al. (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44), такие как, подвешивание задних конечностей животных, иммобилизация лимба и контролируемая искусственной вентиляции легких.

Соответствующие животные модели для исследования эффективности антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению в лечении метаболических нарушений включают в себя без ограничения те, которые раскрыты в Ramaro et al. (*Indian J Med Res* 2007;125:451-472) и Kennedy et al. (*Disease Models & Mechanisms* 2010;3:156-166), оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Не ограничивающие примеры таких животных моделей включают в себя мышей Lep^{ob/ob}, мышей Leprd, мышей Kuo Kondo, мышей KK^{Ay}, Ново Зеландских мышей с ожирением (NZO), мышей NONcNZO10, мышей с сахарным диабетом и ожирением Tsumara Suzuki (TSOD) и без ожирения Tsumara (TSNO), мышей M16, жирных крыс Zucker, диабетических жирных крыс Zucker, крыс SHR/N-ср, крыс JCR/LA-ср, жирных крыс Otsuka Long Evans Tokushima, макак-резусов с ожирением, диабетических крыс Cohen, крыс Goto-Kakizaki и мутантных мышей без ожирения C57 BL/6 (Akita). Сахарный диабет 2 типа может также быть вызван диетой, например, с помощью кормления пищей с высоким содержанием жира не страдающих от ожирения и сахарного диабета мышей C57BL6 (Surwit et al., *Diabetes* 1988;37:1163-7). Сахарный диабет 2 типа может также быть химически индуцирован, например, голдтиоглюкозой (Le Marchand Brustel et al., *Am J Physiol* 1978;234:E348-58) или стрептозотоцином или индуцирован хирургически (например, диабетические животные с частичной панкреотомией) (McNeil JH., *Experimental models of diabetes*. Florida, US: CRC Press LLC; 1999; Sasaki et al., *In Vivo* 2000;14:535-41). Многие генетические животные модели, как известно, воспроизводят симптомы и фенотипы метаболических нарушений, таких как рассмотренные в Kennedy et al., 2010 (выше).

Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению в увеличении мышечной массы или объема может быть исследована с помощью подкожной инъекции мышам, как описано в примере 9. Учитывая, что ингибирование миостатина увеличивает мышечную массу, ожидается, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению будут увеличивать массу тела и мышечную массу в степени, которую можно использовать для определения активности аднектинов.

Согласно некоторым вариантам осуществления, в частности, когда антимиостатиновые аднектины представляют собой иммуногенные у мышей (например, за счет использования домена человеческого фибронектина типа III) и желательны хронические воздействия, то антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть введены SCID мышам, которые не могут поддерживать клеточный или гуморальный иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления мыши SCID могут быть скрещены с другими генетическими моделями, такими, как те, которые описаны в настоящем документе (например, мышами с диабетом), чтобы разработать мышиную модель с ослабленным иммунитетом, поддающуюся длительному лечению с антимиостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению.

VIII. Терапевтические применения

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрены антимиостатиновые аднектины, применимые для лечения связанного с миостатином заболевания или нарушений, например, нарушений, связанных с мышечной слабостью, мышечной атрофией, нарушений обмена веществ, а также дегенеративных заболеваний костей. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение эффективного количества связывающего миостатин полипептида, т.е., антимиостатинового аднектина, субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины представляют собой фармацевтически приемлемые для млекопитающего, в частности, человека. Термин "фармацевтически приемлемый" полипептид относится к полипептиду, который вводят в организм животного без значительных побочных медицинских последствий, таких, как по существу без эндотоксинов или с очень низким содержанием эндотоксинов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту в комбинации (одновременно или по отдельности) со средством, известным в настоящей области техники как полезное при конкретном нарушении или заболевании, которое подвергают лечению.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов-мишеней для терапии с антимиостатиновым аднектином представляет собой ту, у которой не

поддается стандартной терапии заболевание, нарушение или состояние, которое лечат из-за, например, возраста, уже существующих условий, генетического строения и/или сопутствующих заболеваний. Антимииостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут служить в качестве альтернативы для существующих способов лечения, которые связаны со значительными побочными эффектами (например, на репродуктивную функцию) или из соображений безопасности.

Иллюстративные заболевания, нарушения и состояния, для которых будут применимы антимииостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению, описаны более подробно ниже.

Мышечные, неврологические и метаболические заболевания и нарушения

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения мышечных, неврологических и метаболических нарушений, связанных с мышечной слабостью и/или мышечной атрофией. Например, избыточная экспрессия миостатина *in vivo* вызывает признаки и симптомы, характерные для кахексии, и связывающие миостатин средства могут частично противодействовать эффекту миостатина на атрофию мышц (Zimmers et al., *Science* 2002;296:1486-8). Пациенты со СПИД также проявляют повышенное сывороточное содержание миостатинового иммунореактивного материала, по сравнению с пациентами без СПИД или пациентами со СПИД, у которых не проявляется потеря веса (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS* 1998;95:14938-43). Кроме того, было отмечено, что устранение специфического для сердца миостатина уменьшает атрофию скелетных мышц у мышей с сердечной недостаточностью, и наоборот, специфической гиперэкспрессии миостатина в сердце достаточно, чтобы вызвать потерю мышечной массы (Breitbart et al., *AJP-Heart*; 2011;300:H1973-82). В отличие от этого, нокаутные по миостатину мыши обнаруживают увеличение мышечной массы и снижение зависимости от возраста в накоплении жира, по сравнению с их собратьями дикого типа (McPherron et al., *J. Clin. Invest.* 2002;109:595-601).

Иллюстративные нарушения, которые можно лечить в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, включают в себя миопатию и невропатию, включающую в себя, например, заболевание двигательных нейронов, нервно-мышечные и неврологические нарушения.

Например, антимииостатиновые аднектины могут быть использованы для лечения унаследованных миопатий и нервно-мышечных нарушений (например, мышечной дистрофии (Gonzalez-Kadavid et al., *PNAS*, 1998;95:14938-43), нарушений

двигательных нейронов, врожденных миопатий, воспалительных миопатий и метаболических миопатий), а также приобретенных миопатий (например, индуцированной лекарственными средствами миопатии, индуцированной токсинами миопатии, индуцированной инфекцией миопатии, паранеопластической миопатии и других миопатий, связанных с критическими заболеваниями).

Такие нарушения включают в себя без ограничения мышечную дистрофию Дюшенна, прогрессирующую мышечную дистрофию, мышечную дистрофию типа Беккера, мышечную дистрофию Дежерин-Ландузи, мышечную дистрофию Эрба, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, тазово-поясную мышечную дистрофию, окулофарингеальную мышечную дистрофию (OPMD), плече-лопаточно-лицевую миопатию, врожденную мышечную дистрофию, детскую нейроаксональную мышечную дистрофию, миотоническую дистрофию (заболевание Штейнерта), дистальную мышечную дистрофию, немалиновую миопатию, семейный периодический паралич, недистрофическую миотонию, периодические параличи, спинальную мышечную атрофию (SMA), боковой амиотрофический склероз (ALS), первичный боковой склероз (PLS), прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), дистальную миопатию, миотубулярную/цетронуклеарную миопатию, немалиновую миопатию, заболевание малых стержней, заболевание центрального стержня, десминопатию, миозит с включенными тельцами, дерматомиозит, полимиозит, митохондриальную миопатию, врожденный миастенический синдром, миастению, постполиомиелитную дисфункцию мышц, стероидную миопатию, алкогольную миопатию, периоперационную мышечную атрофию и нейромиопатию ICU.

Наследственные и приобретенные нейропатии и радикулопатии, которые можно лечить с помощью антимиостатиновых аднектинов включают в себя без ограничения ригидный синдром позвоночника, мышечно-глазо-мозговое заболевание, наследственную двигательную и сенсорную нейропатию, заболевание Шарко-Маршутта, хроническую воспалительную нейропатию, прогрессирующую гипертрофическую нейропатию, нейропатию со склонностью к параличам от сдавливания, волчанку, синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, рассеянный склероз, саркоидоз, диабетическую нейропатию, алкогольную нейропатию, связанные с заболеваниями нейропатии (например, ВИЧ/СПИД, болезнь Лайма), связанные с токсинами нейропатии (например, тяжелыми металлами, химиотерапией), компрессионную нейропатию (например, опухоли, нейропатия сдавливания) и нейропатии, связанные с

повреждением или травмой (например, синдром конского хвоста, параплегия, тетраплегия).

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения мышечных дистрофий (например, мышечной дистрофии Дюшенна, мышечной дистрофии типа Беккера), ALS и саркопении.

Дополнительные нарушения, связанные с мышечной атрофией, которые можно лечить с антимиостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению, включают в себя кахексию, синдром истощения, саркопению, застойное обструктивное заболевание легких, муковисцидоз (легочную кахексию), заболевания сердца или недостаточность (сердечная кахексия), злокачественную опухоль, слабость вследствие СПИД, слабость из-за почечной недостаточности, почечную недостаточность, хромоту, связанную с диализом кахексию, уремию, ревматоидный артрит, травму мышц, хирургию, восстановление поврежденных мышц, слабость, дисфункциональную атрофию, остеопороз, остеоартрит, рост и восстановление связок.

Способы согласно настоящему изобретению также могут быть использованы для увеличения объема мышц у пациентов, которые страдают от атрофии мышц, обусловленной бездействием. Дисфункциональная атрофия может представлять собой результат многочисленных причин, включающих в себя любое нарушение или состояние, которое приводит к длительной неподвижности или бездействию, включая в себя без ограничения затянувшийся постельный режим, нахождение в инвалидной коляске, иммобилизацию конечностей, разгрузку диафрагмы через ИВЛ, трансплантацию солидных органов, замену сустава, инсульт, связанная с поражением ЦНС слабость, повреждение спинного мозга, восстановление после серьезных ожогов, малоподвижный хронический гемодиализ, восстановления после травм, восстановление после сепсиса и воздействия невесомости (Powers et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44).

Кроме того, связанное с возрастом увеличение соотношения жира к мышцам и связанная с возрастом мышечная атрофия, по всей видимости, связана с миостатином. Например, средний сывороточный миостатин-иммунореактивный белок увеличивается с возрастом в группах молодых (19-35 лет), среднего возраста (36-75 лет) и пожилых (76-92 лет) мужчин и женщин, в то время как средняя мышечная масса и масса без жира снижалась с возрастом в этих группах (Yarasheski et al. *J Nutr*

Aging 6(5):343-8 (2002)). Соответственно, субъекты с мышечной атрофией в результате старения и/или субъекты, которые слабые в результате, например, саркопении, также будут получать пользу от лечения с антимииостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению.

Также рассматриваются способы увеличения мышечной массы у сельскохозяйственных животных путем введения эффективной дозы антимииостатиновых аднектинов этим животным. Поскольку зрелый С-концевой полипептид-миостатин идентичен у всех видов, можно было бы ожидать, что антимииостатиновые аднектины будут эффективно увеличивать мышечную массу и снижать жир у любых агрономически важных видов, например, но без ограничения, крупного рогатого скота, куриц, индеек и свиней.

Эффективность антимииостатинового аднектина при лечении связанных со слабостью мышц или атрофией мышц нарушений может быть определена, например, с помощью одного или нескольких способов измерения увеличения мышечной массы или объема, увеличения числа мышечных клеток (гиперплазии), увеличения размеров мышечной клетки (гипертрофии) и/или повышения мышечной силы. Например, эффекты увеличения объема мышц антимииостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению показаны в примерах, описанных ниже. Способы определения "увеличенной мышечной массы" хорошо известны в настоящей области техники. Например, содержание мышц может быть измерено до и после введения антимииостатинового аднектина согласно настоящему изобретению с использованием стандартных способов, таких как подводное взвешивание (смотрите, например, Bhasin et al. New Eng. J. Med. (1996) 335:1-7) и двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (смотрите, например, Bhasin et al. Mol. Endocrinol. (1998) 83:3155-3162). Увеличение размеров мышц может быть доказано увеличением веса по меньшей мере приблизительно на 5-10%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 10-20% и более.

Нарушения обмена веществ

Антимииостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению, которые снижают активность и/или передачу сигналов миостатина, применимы для лечения нарушений обмена веществ, таких как ожирение, сахарный диабет типа II, связанные с сахарным диабетом нарушения, метаболический синдром и гипергликемия.

Миостатин участвует в патогенезе сахарного диабета типа II. Миостатин экспрессируется в жировой ткани и дефицитные по миостатину мышцы проявляют

сниженное накопление жира, когда они стареют. Кроме того, глюкозная нагрузка, накопление жира и общая масса тела уменьшаются у не содержащих миостатин агутти (летальных желтых) мышей с ожирением ($Lep^{ob/ob}$) (Yen et al., *FASEB J.* 8:479, 1994; McPherron et al., 2002). Как описано в US2011/0008375, миостатиновые антагонисты могут уменьшать соотношение жира к мышцам в возрастной мышечной модели, сохранять массу скелетных мышц и сухую массу тела и ослаблять гипертрофию почек у индуцированных STZ диабетических мышей.

Используемый в настоящем документе термин "ожирение" представляет собой состояние, при котором избыток жира тела накапливается до такой степени, что на здоровье может оказываться негативное влияние. Обычно это определяется как индекс массы тела (ИМТ) 30 кг/м^2 и выше, который отличает его от избыточного веса, как определено в ИМТ 25 кг/м^2 и выше (смотрите, например, World Health Organization (2000) (PDF). Technical report series 894: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization). Избыточная масса тела связана с различными заболеваниями, в частности, сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом типа II, синдромом обструктивного апноэ во сне, некоторыми типами злокачественных опухолей и остеоартритом.

Субъекта с ожирением можно идентифицировать, например, путем определения ИМТ (ИМТ рассчитывается путем деления массы субъекта на квадрат его или ее роста), окружности талии и соотношения талии и бедер (абсолютная окружность талии ($> 102 \text{ см}$ у мужчин и $> 88 \text{ см}$ у женщин) и соотношение окружностей талии и бедер (окружность талии, разделенная на окружность бедер $> 0,9$ для мужчин и $> 0,85$ для женщин) (смотрите, например, Yusuf S, et al., (2004). *Lancet* 364: 937–52) и/или содержания жира в организме (общий жир в организме, выраженный в процентах от общего веса тела: мужчины с более чем 25% жира и женщины с более чем 33% жира страдают от ожирения; процентное содержание жира в организме может быть оценено по ИМТ человека по следующей формуле: $\text{жир}\% = (1,2 * \text{ИМТ}) + (0,23 * \text{возраст}) - 5,4 - (10,8 * \text{пол})$, где пол составляет 0, если женщина, и 1, если мужчина). Техники измерения процента жира в организме тела включают в себя, например, компьютерную томографию (КТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ) и двухэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию (DEXA).

Термин "сахарный диабет типа II" относится к хроническому, продолжающемуся в течение всей жизни заболеванию, которое возникает, когда инсулин в организме не может эффективно работать. Основной компонент сахарного диабета типа II

представляет собой "резистентность к инсулину", при которой инсулин, вырабатываемый поджелудочной железой, не может соединиться с жировыми и мышечными клетками, чтобы позволить глюкозе попасть внутрь для производства энергии, в результате чего возникает гипергликемия (высокий уровень глюкозы в крови). Чтобы компенсировать это, поджелудочная железа вырабатывает больше инсулина, а клетки, чувствуя это наводнение инсулином, становятся еще более устойчивыми, приводя к порочному кругу высокого содержания глюкозы и частому высокому содержанию инсулина.

Используемая в настоящем документе фраза "связанные с сахарным диабетом нарушения" или "нарушения, связанные с сахарным диабетом", или "относящиеся к сахарному диабету нарушения" относится к состояниям и другим заболеваниям, которые обычно связаны с или относятся к сахарному диабету. Примеры нарушений, связанных с сахарным диабетом, включают в себя, например, гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию, инсулинорезистентность, нарушенный метаболизм глюкозы, ожирение, диабетическую ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, катаракту, диабетическую нефропатию, гломерулосклероз, диабетическую нейропатию, эректильную дисфункцию, предменструальный синдром, рестеноз сосудов, язвенный колит, ишемическое заболевание сердца, гипертоническое заболевание, стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, нарушения кожи и соединительной ткани, язвы ног, метаболический ацидоз, артрит и остеопороз.

Эффективность антимиостатиновых аднектинов в лечении метаболических нарушений может быть определена, например, с помощью одного или нескольких способов измерения увеличения чувствительности к инсулину, увеличения захвата глюкозы клетками от субъекта, снижения содержания глюкозы в крови, а также уменьшения жира в организме.

Например, у субъектов с сахарным диабетом типа II или у тех, которые подвержены риску развития сахарного диабета, могут контролироваться уровни HbA1c. Используемый в настоящем документе термин "гемоглобин 1AC" или "HbA1c" относится к продукту неферментативного гликирования цепи гемоглобина В. Желаемый диапазон-мишень уровней HbA1c для людей с сахарным диабетом может быть определен из руководства Американской диабетической ассоциации (ADA), т.е. стандартов медицинской помощи при диабете (*Diabetes Care* 2012;35(Suppl 1):S511-563). Текущие уровни HbA1c, как правило, <7,0% для людей с сахарным диабетом, а люди, которые не страдают от сахарного диабета, как правило, характеризуются

значениями HbA1c менее чем 6%. Соответственно, эффективность антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению может быть определена с помощью наблюдаемого снижения уровня HbA1 у субъекта.

Способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают введение антимиостатинового аднектина отдельно или в комбинации с другими средствами, которые известны в настоящей области техники для гликемического контроля (например, инсулин, GLP1) или для лечения известных в настоящей области техники связанных с диабетом осложнений.

Другие нарушения

Миостатиновые нокаутные мыши проявляют увеличение мышечной массы, а также увеличение содержания минеральных веществ и плотность плечевой кости мыши, и увеличение содержания минеральных веществ как в трабекулярной, так и в кортикальной кости в областях, где прикрепляются мышцы (Hamrick et al. *Calcif Tissue Intl* 2002;71:63-8). Это говорит о том, что увеличение мышечной массы может помочь улучшить прочность костей и уменьшить остеопороз и другие дегенеративные заболевания костей.

Дополнительные заболевания или нарушения, для которых применимы антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению, включают в себя заживление ран, антифиброзное заболевание, синдром Итона-Ламберта и заболевание Паркинсона.

Комбинированные способы лечения

Предусмотренные в настоящем документе антимиостатиновые аднектины могут быть использованы в сочетании с противодиабетическими средствами, противогипергликемическими средствами, противогиперинсулинемическими средствами, противоретинопатическими средствами, противоневропатическими средствами, противонейродегенеративными средствами, противонепропатическими средствами, противоатеросклеротическими средствами, противоишемическими средствами, противогипертензивными средствами, средствами против ожирения, противодислипидемическими средствами, противогиперлипидемическими средствами, противогипертриглицеридемическими средствами, противогиперхолестеринемическими средствами, противорестенопатическими средствами, противопанкреатическими средствами, гиполипидемическими средствами, средствами анорексии, улучшающими память средствами, средствами против деменции или способствующими когнитивной функции средствами,

супрессантами аппетита, нейро- или опорновосстановительными процедурами, лечением сердечной недостаточности, лечением заболеваний периферических артерий и противовоспалительными средствами.

Противодиабетические средства, используемые в сочетании с антимиостатиновыми аднектинами, включают в себя без ограничения стимуляторы секреции инсулина или сенситизаторы инсулина, модуляторы рецептора GPR40 или другие противодиабетические средства. Эти средства включают в себя без ограничения ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DP4) (например, ситаглиптин, саксаглиптин, алоглиптин, вилдаглиптин и т.п.), бигуаниды (например, метформин, фенформин и т.п.), сульфонилмочевины (например, глибурид, глимепирид, глипизид и т.п.), ингибиторы глюкозидазы (например, акарбозу, миглитол и т.п.), агонисты PPAR γ , такие как тиазолидиндионы (например, розиглитазон, пиоглитазон и т.п.), двойные агонисты PPAR- α/γ (например, мураглитазар, тезаглитазар, алеглитазар и т.п.), активаторы глюкокиназы (как описано в Fyfe et al., *Drugs of the Future*, 34(8):641-653 (2009) и включено в настоящий документ посредством ссылки), модуляторы рецептора GPR119 (MBX-2952, PSN821, APD597 и т.п.), ингибиторы SGLT2 (дапаглифлозин, канаглифлозин, ремаглифлозин и т.п.), аналоги амилаина, такие как прамлинтид и/или инсулин. Обзоры о текущих и новых способах лечения сахарного диабета могут быть найдены в: Mohler et al., *Medicinal Research Reviews*, 29(1):125-195 (2009) и Mizuno et al., *Current Medicinal Chemistry*, 15:61-74 (2008).

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут также быть необязательно использованы в сочетании с одним или несколькими гипофагическими средствами, такими как диэтилпропион, фендиметразин, фентермин, сибутрамин, орлистат, лорказерин, прамлинтид, топирамат, антагонисты рецепторов MCHR1, оксинтомодулин, налтрексон, амилинпептид, модуляторы рецепторов NPY Y5, модуляторы рецепторов NPY Y2, модуляторы рецепторов NPY Y4, цетилистат, модуляторы рецепторов 5HT2c и тому подобное. Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть также использованы в сочетании с агонистом рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1 R), таким как экзенатид, лираглутид, GPR-1(1-36) амид, GLP-1(7-36) амид, GLP-1(7-37) (как описано в патенте США № 5614492 на Habener, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки), которые могут быть введены с помощью инъекции, интраназально или с помощью трансдермальных или буккальных устройств. Обзоры текущих и новых способов лечения ожирения могут быть найдены в: Melnikova et al.,

Nature Reviews Drug Discovery, 5:369-370 (2006); Jones, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 8:833-834 (2009); Obici, *Endocrinology*, 150(6):2512-2517 (2009) и Elangbam, *Vet. Pathol.*, 46(1):10-24 (2009).

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению также могут быть введены с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами в зависимости от конкретного подвергаемого лечению заболевания или нарушения. Неограничивающие примеры дополнительных средств включают в себя те, которые применимы для лечения нарушений обмена веществ, таких как сахарный диабет II типа и саркопения, и включают в себя без ограничения GLP-1, подобный GLP-1, амилин и FGF21; те, которые применимы для лечения антифиброзного заболевания, нервно-мышечного заболевания, заболевания двигательных нейронов и саркопении и включают в себя без ограничения грелин, SARM, рилузол, тестостерон, андрогены, гормон роста, гормональную заместительную терапию, ингибиторы COX-2, активаторы тропонина, β 2-агонисты, CTLA4-Ig (например, абетацепт, белатацепт) и антитела к TGF β ; те, которые применимы для лечения кахексии и других синдромов слабости и включают в себя без ограничения ингибиторы киназы рецепторов TGF β , анти-IL-6 и убиквитин-протеасомные ингибиторы; те, которые применимы для лечения мышечных спазмов, связанных с миотонией и PLS, включают в себя без ограничения фитоин, хинин, баклофен и тизанидин; те, которые применимы для нейропатии включают в себя антидепрессанты (например, трициклические и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (SNRI)), противосудорожные средства, канбиноиды, ботулинический токсин типа А, антагонисты NMDA (например, кетамин), пищевые добавки (например, альфа-липоевая кислота и бенфотиамин); те, которые применимы для лечения хронических воспалительных нейропатий, включают в себя без ограничения кортикостероиды, внутривенный иммуноглобулин и иммуносупрессивные лекарственные средства (например, циклофосфамид, циклоспорин, азатиоприн, микофенолятмофетил, глобулин против тимоцитов, ритуксимаб); и те, которые применимы для лечения синдрома Гийена-Барре, саркопении, перелома и потери костной массы, и включают в себя без ограничения Бонива (ибандронат) и PTH.

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть введены с одним или несколькими дополнительными средствами, используемыми в симптоматической терапии. Не ограничивающие примеры таких средств для лечения симптомов ALS включают в себя активаторы митохондриальных пор переходной

проницаемости (MPT), активаторы тропонина быстрых скелетных мышц, регуляторы макрофагов (например, NP001), средства лечения лизосомального заболевания накопления (например, NP003) и антагонисты никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR). Не ограничивающий пример дополнительного средства для использования в лечении симптомов DMD/BMD представляет собой средство, которое повышает содержание АТФ.

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению также могут быть введены с одним или несколькими дополнительными средствами, используемыми в модифицирующей заболевание терапии. Неограничивающие примеры таких средств для лечения ALS включают в себя акцепторы свободных радикалов (например, эдаравон (норфеназон) CV-3611), агонисты VEGF (например, sNN0029), белок Nogo-A I (например, GSK122324), ингибиторы SOD1 (например, ISIS-SOD1Rx) и ингибиторы PGE синтазы 1 (например, AAD-2004). Неограничивающие примеры таких средств для лечения DMD/BMD включают в себя те, которые способствуют пропуску экзона (например, антисмысловые молекулы, такие как дрисаперсен (PRO051/GSK2402968), PRO044, этеплирсен, AVI-4658, AVI-5038, аталурен (PTC124)), средства генной терапии, противовоспалительные средства (например, CRD007) и антифиброзные средства (например, HT-100).

Как обсуждалось выше, способствующие пропуску экзонов средства могут быть использованы в сочетании с анtimiостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению для лечения мышечной дистрофии Дюшенна и мышечной дистрофии типа Беккера. Примеры специфических экзонов, на которые можно направленно воздействовать для восстановления функционального дистрофина, включают в себя экзоны 7, 8, 17, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 и 55 (смотрите, например, Lu et al., *Molecular Therapy* 2011;19:9-15). Согласно некоторым вариантам осуществления более чем одно средство, например, антисмысловые олигонуклеотиды, может быть использовано, чтобы индуцировать пропуск нескольких экзонов.

IX. Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем документе анtimiостатиновый аднектин или его слитые белки, причем композиция, по существу, свободна от эндотоксинов или по меньшей мере содержат не более чем приемлемое содержание эндотоксинов, как определено с помощью соответствующего регуляторного органа (например, FDA).

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть 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 введения.

Хорошо известные в настоящей области техники способы для получения композиций можно найти, например, в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). Композиции для парентерального введения могут, например, содержать вспомогательные вещества, стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталины. Биосовместимый биоразлагаемый полимер лактида, лактид/гликолидный сополимер или сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена могут быть использованы для контроля высвобождения соединений. Композиции наночастиц (например, биоразлагаемые наночастицы, твердые липидные наночастицы, липосомы) могут быть использованы для управления биораспределением соединений. Другие потенциально применимые парентеральные системы доставки включают в себя частицы ацетатного сополимера этилен-винила, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в композиции варьирует в зависимости от ряда факторов, включающих в себя дозу лекарственного средства для введения и пути введения.

Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы представляют собой нетоксичные для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включающие в себя аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; 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,

включающие в себя глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-протеиновые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть необязательно введены в виде фармацевтически приемлемой соли, такой как нетоксичные кислотнo-аддитивные соли или комплексы металлов, которые обычно используются в фармацевтической промышленности. Примеры кислотнo-аддитивных солей включают в себя органические кислоты, такие как уксусная, молочная, пимовая, малеиновая, лимонная, яблочная, аскорбиновая, янтарная, бензойная, пальмитиновая, пробковая, салициловая, винная, метансульфоновая, толуолсульфоновая или трифторуксусная кислоты или т.п.; полимерные кислоты, такие как дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза или тому подобные; и неорганические кислоты, такие как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота и т.п. Комплексы металлов включают в себя цинк, железо и т.п. В одном примере полипептид составлен в присутствии ацетата натрия для увеличения термической стабильности.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулу, полученную, например, с помощью техник коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозная или желатиновая микрокапсула и поли(метилметакрилатная) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие техники описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие белки согласно настоящему изобретению, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают в себя сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилата) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и

гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксибутировую кислоту. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота способны высвобождать молекулы в течение более чем 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные белки согласно настоящему 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 возможным изменениям в иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружен механизм агрегации, приводящий к образованию межмолекулярной S-S связи через тио-дисульфидный обмен, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контролирования содержания влаги, использования соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

Композиции согласно настоящему изобретению для перорального применения включают в себя таблетки, содержащие активный ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу и сорбит), смазочные средства, скользящие вещества и антиадгезивы (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк). Композиции для перорального применения могут быть также предусмотрены 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 для использования для введения *in vivo*, как правило, должны быть стерильной. Это может быть достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Когда композицию лиофилизируют, стерилизация с использованием этого способа может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиция для парентерального введения

может быть сохранена в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, содержащий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора, содержащий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции.

После того, как фармацевтическая композиция составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в виде готовой к употреблению формы, либо в форме (например, лиофилизированной), требующей воссоздания перед введением.

Композиции в настоящем документе могут также содержать более одного активного соединения, если необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно те, с дополнительными активностями, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Такие молекулы могут присутствовать в комбинации в количествах, которые эффективны для определенной цели.

X. Введение

Фармацевтическая композиция, содержащая антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению, может быть введена субъекту с риском развития или проявлением описанных в настоящем документе патологий с использованием стандартных техник введения, включающих в себя пероральное, парентеральное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, трансбуккальное, сублингвальное или суппозиторное введение. Предпочтительно, введение антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению представляет собой парентеральное. Используемый в настоящем документе термин парентеральный включает в себя внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или внутрибрюшинное введение. Предпочтительно периферийная системная доставка путем внутривенной или внутрибрюшинной, или подкожной инъекции.

Терапевтически эффективная доза относится к дозе, которая производит терапевтический эффект, для которого ее вводят. Эффективное количество фармацевтической композиции для терапевтического использования будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что соответствующие уровни доз для лечения, таким образом, будут изменяться в зависимости, в частности, от доставляемой молекулы, указания, для которого молекула-связывающее средство используется, пути введения и размера

(веса тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента.

Например, терапевтически эффективная доза может быть оценена первоначально либо в анализах клеточных культур, либо на моделях животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Животная модель может быть также использована для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация может быть использована для определения подходящих доз и путей введения человеку.

Точная дозировка будет определяться в свете факторов, связанных с требующим лечения субъектом, и может быть установлена с помощью стандартных техник. Дозировка и введение корректируются, чтобы обеспечить достаточное содержание активного соединения или для поддержания желаемого эффекта. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают в себя тяжесть состояния заболевания, общее состояние здоровья субъекта, возраст, массу тела и пола субъекта, время и частоту введения, комбинацию(и) лекарственных средств, чувствительность реакции и ответ на терапию. В общем, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению вводят в количестве, равном приблизительно от 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг в день, предпочтительно от 0,01 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг в день, наиболее предпочтительно от 0,01 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг в день. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению вводят в еженедельных дозах, составляющих от приблизительно 1 до 50 мг, более предпочтительно приблизительно 10-50 мг. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению вводят в месячных дозах, равных 30-200 мг, предпочтительно 50-150 мг, а более предпочтительно 60-120 мг.

Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров связывания молекулы-средства в используемом составе. Как правило, композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая позволяет достичь желаемого эффекта. Таким образом, композиция может быть введена в виде разовой дозы или в виде нескольких доз (в той же или разных концентрациях/дозах) с течением времени, или в виде непрерывной инфузии. Обычно осуществляют дополнительное совершенствование соответствующей дозировки. Соответствующие дозы могут быть определены с помощью использования соответствующих данных доза-ответ. Например, антимиостатиновый аднектин может быть вводиться ежедневно

(например, один раз, два раза, три раза или четыре раза в день) или реже (например, один раз в день, раз или два раза в неделю или раз в месяц). Кроме того, как известно в настоящей области техники, могут быть необходимы корректировки по возрасту, а также весу тела, общему состоянию здоровья, полу, диеты, времени введения, взаимодействия лекарственных средств, а также тяжести заболевания, и будут поддаваться определению с помощью обычных экспериментов специалистами в настоящей области техники. Антимииостатиновый аднектин соответствующим образом вводят пациенту одновременно или в виде серии введений.

Введение антимииостатинового аднектина или его слияния и одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, вводимых совместно или последовательно, может происходить, как описано выше для терапевтических применений. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и вспомогательные вещества для совместного введения будут зависеть от идентичности конкретного вводимого терапевтического средства.

XI. Способы обнаружения и диагностики

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть также использованы в различных диагностических применениях. Например, антимииостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению может быть использован для диагностики нарушения или заболевания, связанного с повышенным содержанием миостатина. Аналогичным образом, антимииостатиновый аднектин может быть использован в анализе для контроля содержания миостатина у субъекта, подвергающегося лечению от связанного с миостатином состояния. Антимииостатиновые аднектины могут быть использованы с или без модификации и помечены путем ковалентного или нековалентного прикрепления детектируемого фрагмента. Детектируемый фрагмент может представлять собой любой, который способен производить, прямо или косвенно, обнаруживаемый сигнал. Например, детектируемым фрагментом может быть радиоизотоп, такой как H³, C¹⁴ или ¹³P, ³²P, ³⁵S или ¹¹³1; флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена.

Может быть использован любой известный в настоящей области техники способ для конъюгации белка с детектируемым фрагментом, включая в себя способы, описанные в Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et

al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981) и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982). Способы *in vitro* включают в себя химию конъюгации, хорошо известную в настоящей области техники, включая в себя химию, совместимую с белками, такую как химия конкретных аминокислот, таких как Cys и Lys. Для того чтобы связать фрагмент (такой как, ПЭГ) с белком согласно настоящему изобретению, используется связывающая группа или реакционноспособная группа. Подходящие связывающие группы хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолабильные группы, фотоллабильные группы, пептидазоллабильные группы и эстеразоллабильные группы. Предпочтительные связывающие группы представляют собой дисульфидные группы и тиоэфирные группы в зависимости от применения. Для полипептидов без аминокислоты Cys, Cys может быть сконструирован в локации, чтобы позволить активности протеина существовать при создании локации для конъюгации.

Антимиостатиновые аднектины, связанные с детектируемым фрагментом, также применимы для визуализации *in vivo*. Полипептид может быть связан с рентгеноконтрастным средством или радиоизотопом, вводимым субъекту, предпочтительно в кровоток, и у субъекта анализируют присутствие и расположение меченого белка. Эта техника визуализации применима в постановке и лечении злокачественных опухолей. Белок может быть помечен любым фрагментом, который обнаруживается у субъекта либо ядерным магнитным резонансом, радиологией, либо другим средством обнаружения, известным в настоящей области техники.

Антимиостатиновые аднектины также применимы в качестве аффинных средств очистки. В этом процессе полипептиды иммобилизуют на подходящей подложке, такой как смола Sephadex или фильтровальная бумага, с использованием способов, хорошо известные в настоящей области техники.

Антимиостатиновые аднектины могут быть использованы в любом известном способе анализа, таком как анализ конкурентного связывания, прямые и косвенные сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Согласно некоторым аспектам в настоящем изобретении предусмотрены способы обнаружения молекулы-мишени в образце. Способ может включать контактирование образца с описанными в настоящем документе анtimiостатиновыми аднектинами, причем указанное контактирование осуществляется в условиях, которые позволяют образование комплекса анtimiостатиновый аднектин-мишень; и обнаружение

указанного комплекса, тем самым обнаруживая указанную мишень в указанном образце. Обнаружение можно проводить с использованием любой известной в настоящей области техники технологии, такой как, например, радиография, иммунологический анализ, обнаружение флуоресценцией, масс-спектрометрия или поверхностный плазмонный резонанс. Образец может быть от человека или другого млекопитающего. Антимииостатиновые аднектины могут быть помечены метящим фрагментом, таким как радиоактивный фрагмент, флуоресцентный фрагмент, хромогенный фрагмент, хемилюминесцентный фрагмент или гаптенный фрагмент. Антимииостатиновые аднектины могут быть иммобилизованы на твердой подложке.

ХП. Наборы и промышленные изделия

Антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению может быть предусмотрен в наборе, в упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями для использования в терапевтических или диагностических способах согласно настоящему изобретению.

Например, согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения изделие, содержащее материалы, применимые для лечения или профилактики описанных выше нарушений или состояний. Изделие содержит контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию согласно настоящему изобретению, которая эффективна для профилактики или лечения нарушения или состояния, и может содержать стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, содержащий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Активное средство в композиции представляет собой антимииостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению. Этикетка на или связанная с контейнером указывает, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включающие в себя другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкциями по применению.

Включение путем ссылки

Все документы и ссылки, включающие в себя описанные в настоящем документе патентные документы и веб-сайты, отдельно включены посредством ссылки в настоящий документ в той же степени, как если бы были написаны в этом документе в полном объеме или частично.

ПРИМЕРЫ

Изобретение описывается со ссылкой на следующие примеры, которые представляют собой только иллюстративные и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. В то время как настоящее изобретение было описано подробно и со ссылкой на конкретные его варианты осуществления, специалисту в настоящей области техники должно быть понятно, что различные изменения и модификации могут быть в них внесены без отхода от сущности и объема изобретения.

Пример 1 - производство белка

Производство белка с высокой пропускной способностью (HTPP)

Выбранные связующие, клонированные в вектор PET9d выше по ходу транскрипции от HIS₆tag и трансформированные в клетки BL21 DE3 plysS *E.coli*, инокулировали в 5 мл LB-среды, содержащей 50 мкг/мл канамицина в 24-луночном формате, и выращивали в течение ночи при 37°C. Свежие культуры в 5 мл среды LB (50 мкг/мл канамицина) готовили для индуцируемой экспрессии путем аспирации 200 мкл из ночной культуры и перенесения в подходящую лунку. Культуры выращивали при 37°C до A600 0,6-0,9. После индукции с 1 mM изопропил-β-тиогалактозидом (IPTG), культуру экспрессировали в течение 6 часов при 30°C и собирали с помощью центрифугирования в течение 10 минут при 2750 g при 4°C.

Клеточные осадки (в 24-луночном формате) лизировали путем ресуспендирования в 450 мкл лизирующего буфера (50 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 1-кратный коктейль ингибитора протеазы Complete™ без ЭДТА (Roche), 1 mM PMSF, 10 mM CHAPS, 40 mM имидазол, 1 мг/мл лизоцима, 30 мкг/мл ДНКазы, 2 мкг/мл апротонина, pH 8,0) и встряхивали при комнатной температуре в течение 1-3 часов. Лизаты очищали и заново сливали в 96-луночный формат путем переноса в 96-луночный Whatman GF/D Unifilter, оснащенный 96-луночным планшетом захвата с объемом 1,2 мл, и фильтровали с помощью положительного давления. Очищенные лизаты переносили в 96-луночный никель или кобальт-хелатирующий планшет, который был уравновешен

с уравнивающим буфером (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl , 40 mM имидазол, pH 8,0) и инкубировали в течение 5 мин. Несвязанный материал удаляли с помощью положительного давления. Смолу дважды промывали с промывочным буфером #1 (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl , 5 mM CHAPS, 40 mM имидазол, pH 8,0) в объеме 0,3 мл/лунку. Каждое отмывание удаляли положительным давлением. Перед элюированием каждую лунку промывали с 50 мкл элюирующего буфера (PBS + 20 mM ЭДТА), инкубировали в течение 5 мин и это отмывание сливали с помощью положительного давления. Белок элюировали путем применения дополнительных 100 мкл элюирующего буфера в каждую лунку. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре планшет(ы) центрифугировали в течение 5 минут при 200 g и элюированный белок собирали в 96-луночных планшетах для улавливания, содержащих 5 мкл 0,5 M MgCl_2 , добавленного на дно планшета для улавливания до элюирования. Элюированный белок количественно определяли с использованием анализа общего белка с доменом $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа в качестве белкового стандарта.

Экспрессия и очистка нерастворимых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих

Для экспрессии выбранный клон(ы) с последующей меткой His_6tag , клонировали в вектор pET9d и экспрессировали в клетках BL21 DE3 *plysS E.coli*. Двадцать мл инокулята культуры (полученного из одной высеянной колонии) использовали для инокуляции 1 литра среды LB или сред TB-Overnight Expression (автоиндукция), содержащей 50 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры в среде LB инкубировали при 37°C до A_{600} 0,6-1,0, после чего на них воздействовали 1 mM изопропил- β -тиогалактозидом (IPTG) и культивировали в течение 4 часов при 30°C. Культуры, выращенные в средах TB-Overnight Expression, инкубировали при 37°C в течение 5 часов, после чего температуру снижали до 18°C и выращивали в течение 19 часов. Культуры собирали центрифугированием в течение 30 минут при ≥ 10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. После оттаивания клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл буфера для лизиса (20 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl , 1-кратный коктейль протеазных ингибиторов Complete™ без ЭДТА (Roche), pH 7,4) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax (IKA works) на льду. Клеточного лизиса достигали с помощью гомогенизации высокого давления ($\geq 18,000$ psi) с использованием микрофлюидайзера Model M-110S (Microfluidics). Нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 минут при ≥ 23300 g при 4°C.

Нерастворимый осадок, извлеченный из центрифугирования лизата, промывали 20 мМ фосфатом натрия/500 мМ NaCl, pH 7,4. Осадок растворяли в 6 М гидрохлорида гуанидина в 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl, pH 7,4 с обработкой ультразвуком, с последующей инкубацией при 37 градусов в течение 1-2 часов. Растворимый осадок фильтровали с 0,45 мкм фильтром и наносили на колонку HiTrap, уравновешенную с буфером 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl/6 М гуанидин pH 7,4. После загрузки колонку промывали дополнительными 25 объемами колонки тем же буфером. Связанный белок элюировали с 50 мМ имидазола в 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl/6 М гуанидин-HCl, pH 7,4. Очищенный белок разворачивали путем диализа против 50 мМ ацетата натрия/150 мМ NaCl, pH 4,5 или PBS, pH 7,2.

Экспрессия и очистка растворимых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих

В качестве альтернативы очистки нерастворимых связующих также может быть использована очистка растворимых связующих. Для экспрессии, выбранный клон(ы) с последующей меткой HIS₆tag клонировали в вектор pET9d и экспрессировали в клетках BL21 DE3 plysS *E.coli*. Двадцать мл инокулята культуры (полученного из одной высевной колонии) использовали для инокуляции 1 литра среды LB или сред TB-Overnight Expression (автоиндукция), содержащей 50 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры в среде LB инкубировали при 37°C до A600 0,6-1,0, после чего на них воздействовали 1 мМ изопропил-β-тиогалактозидом (IPTG) и культивировали в течение 4 часов при 30°C. Культуры, выращенные в средах TB-Overnight Expression, инкубировали при 37°C в течение 5 часов, после чего температуру снижали до 18°C и выращивали в течение 19 часов. Культуры собирали центрифугированием в течение 30 минут при ≥10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. После оттаивания клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл буфера для лизиса (20 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 1-кратный коктейль протеазных ингибиторов Complete[™] без ЭДТА (Roche), pH 7,4) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax (IKA works) на льду. Клеточного лизиса достигали с помощью гомогенизации высокого давления (≥18,000 psi) с использованием микрофлюидайзера Model M-110S (Microfluidics). Растворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 минут при ≥23300 g при 4°C. Супернатант очищали с использованием 0,45 мкм фильтра. Очищенный лизат наносили на колонку HisTrap (GE), предварительно уравновешенную 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl, pH 7,4. Затем колонку

промывали 25 объемами колонки того же самого буфера, после чего 20 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl/25 мМ имидазола, pH 7,4, а затем 35 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl/40 мМ имидазола, pH 7,4. Белок элюировали 15 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ NaCl/500 мМ имидазола, pH 7,4, фракции объединяли на основании поглощения при A_{280} и диализовали против 1-кратного PBS или 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8,5, или 50 мМ NaOAc, 150 мМ NaCl, pH 4.5. Осадок удаляли фильтрованием с помощью 0,22 мкм фильтра.

Сайт-специфическое пегилирование аднектинов с полиэтиленгликолем (ПЭГ)

Аднектины, содержащие сконструированный остаток цистеина, конъюгировали с ПЭГ или блокирующим цистеин реагентом с помощью химии присоединения по Михаэлю между тиольной группой на цистеине и малеимидной функциональной группой ПЭГ или н-этилмалеимида (NEM). Для пегилирования с ПЭГ 40 кДа с 2 ветвями (NOF Corporation, P/N GL2-400MA), ПЭГ добавляли в молярном избытке к раствору белка в слегка кислых или нейтральных условиях. Реакционную смесь оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение от 2 часов до ночи. Реакционную смесь затем наносили на ионообменную колонку, чтобы отделить пегилированный аднектин от непрореагировавшего ПЭГ-малеимида и непегилированного аднектина. Для пегилирования с ПЭГ 40 кДа с 4 ветвями (NOF, P/N GL4-400MA) или бис-ПЭГ 20 кДа (NOF Corporation, P/N DE-200MA), аднектин очищали от SP FF в цитратном буфере, pH 6,5. После восстановления с DTT образец обессаливали на колонке G25 в том же буфере для удаления DTT и подвергали взаимодействию с 20 кД бис-ПЭГ или ПЭГ 40 кДа с 4 ветвями в соотношении 2:1 (ПЭГ:аднектин) в течение 2 часов при комнатной температуре, и реакцию останавливали добавлением избытка BME. Образец очищали на колонке Resource 15S (GE #17-0944-10) с выборочным удалением непегилированных видов (и монопегилированных видов в случае реакции 20 кД бис-ПЭГ). Окончательную препаративную колонку SEC (GE #17-1071-01, Superdex200, 26/60) использовали (в случае необходимости), чтобы удалить высокомолекулярные виды и непрореагировавший аднектин. Чтобы приготовить Cys-блокированный аднектин, 10-кратный молярный избыток NEM (Pierce Chemical) добавляли сразу после вышеуказанной стадии обессоливания G25 в цитратный буфер (pH 6,5). Инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и реакцию останавливали путем добавления избытка BME. Затем образец интенсивно диализовали против PBS.

Очищенные конъюгированные аднектины анализировали с помощью ДСН-ПААГ и эксклюзионной хроматографии.

Очистка и пегилирование немеченых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих

Выбранные связующие клонировали в вектор pET9d без HIS6tag и экспрессировали в клетках BL21 DE3 plysS *E.coli*. 25 мл инокулятов культуры, ранее выделенной из одной высеянной колонии, выращивали в колбе объемом 125 мл, пока OD 600 нм не достигало 1-2, с использованием сред pH 6,85 + 50 мкг/мл канамицина (хлорид аммония, лимонная кислота, железо-аммонийный цитрат, магния сульфат, моногидрат одноосновного фосфата натрия, декстроза безводная, глицерин, фитона пептон, гранулированный дрожжевой экстракт, канамицина сульфат, сульфат аммония для регулирования pH). Ферментер объемом 10 л (7,5 л исходного объема пакетных сред) инокулировали в конечной OD 600 нм равной 0,003. Культуру выращивали в течение ночи при 25°C при постоянном перемешивании при 650 оборотах в минуту и растворенном содержании O₂ > 30% при сохранении pH. На следующий день температуру сдвигали до 37°C, и культуры выращивали пока OD 600 нм не достигало 20-25. После того, как требуемая OD была достигнута, температуру смещали до 30°C и на культуры воздействовали с помощью IPTG (конечная концентрация: 1 mM). Питательные среды (глицерин, фитона пептон, гранулированный дрожжевой экстракт, сульфат канамицина и фосфорная кислота для доведения pH) добавляли со скоростью 40 мл среды/л образованного объема/ч. Клетки собирали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин при 4°C. Осадки клеток замораживали при -80°C.

Клеточную массу оттаивали в 1-кратном PBS в соотношении 10 мл буфера/г пасты клеток. После размораживания образец разрушали в гомогенизаторе UltraTurrax (IKA works) до получения однородной консистенции. Затем раствор пропускали два раза через микрофлюидизатор при 18000 psi. Растворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 минут при ≥ 10000 g при 4°C. Супернатант разводили 1:1 с ацетатом натрия (pH 4,5) и очищали с помощью фильтра 0,2 мкм. Очищенный лизат загружали на колонку SP FF (SP1; GE), предварительно уравновешенную с 50 mM ацетата натрия (pH 4,5). Затем колонку промывали 2 объемами колонки того же самого буфера, после чего 8 объемами колонки 50 mM ацетата натрия/350 mM NaCl, pH 4,5. Белок элюировали с 50 mM ацетата натрия/700 mM NaCl, pH 4,5. Элюирования объединяли на основании поглощения при A₂₈₀.

Элюирование SP1 разводили 1:5 с 20 мМ фосфата натрия (pH 6,7) и наносили на колонку с SP FF (SP2), предварительно уравновешенную с 20 мМ фосфата натрия/100 мМ NaCl, pH 6,7. Затем колонку промывали 2 объемами колонки того же буфера. Белок элюировали из колонки с 20 мМ фосфатом натрия/0,5 М NaCl, pH 6,7. Элюирования объединяли на основании поглощения при A_{280} .

Элюирование SP2 разбавляли до 100 мМ NaCl в 20 мМ фосфата натрия (pH 6,7) и наносили на колонку с Q FF (GE), предварительно уравновешенную с 20 мМ фосфата натрия/100 мМ NaCl, pH 6,7. Собирали пик FT (содержащий продукт). Колонку промывали уравновешивающим буфером до тех пор, пока пик FT не возвращается к исходному уровню.

Аднектины, содержащие сконструированный остаток цистеина, конъюгировали с ПЭГ с помощью химии присоединения по Михаэлю между тиольной группой на цистеине и малеимидной функциональной группой реагента ПЭГ. Фракцию Q FT пегилировали с 40 кДа разветвленным ПЭГ в молярном соотношении 2:1 ПЭГ к белку. Образец инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Реакцию пегилирования разбавляли 2 частями 50 мМ ацетата натрия (pH 4,5) и наносили на колонку с SP FF (GE), предварительно уравновешенную 50 мМ ацетата натрия (pH 4,5). Колонку промывали 2 объемами колонки того же буфера. Пегилированный белок элюировали из колонки с 50 мМ ацетата натрия/200 мМ NaCl, pH 4,5). Элюирования объединяли на основании поглощения при A_{280} . Пегилированный белок концентрировали с использованием 30 кДа мембраны Millipore Biotech. Образец фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили, например, при 4°C, -20°C или -80°C.

Временная экспрессия и очистка Fc-форматированных основанных на фибронектине каркасных белков-связующих

Для получения ДНК отобранных кандидатов клонировали в плазмиду PDV-16, из которой трансформировали клетки Top10 *E. coli*. PDV-16 представляет собой модифицированную версию pTT5 (Yves Durocher, NRC Canada), в которую была введена кодирующая последовательность IgG1-Fc человека, которой предшествует сигнальная последовательность, и были включены сайты рестрикции, чтобы позволить вставку кодирующих аднектин последовательностей на обоих концах Fc. Трансформированные клетки наращивали путем инокуляции 1 л бульона Лурии, содержащего 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали во вращающемся термостате при 225 оборотах в минуту в течение 18 часов при 37°C. Бактериальные осадки собирали центрифугированием при $> 10000g$ в течение 30 минут при 4°C. Очищенную

плазмидную ДНК выделяли с использованием набора QIAGEN Plasmid Plus Mega (QIAGEN), как описано в протоколе производителя. Очищенную ДНК количественно определяли с использованием оптической плотности при 260 нм и замораживали при -80°C перед использованием.

Клетки НЕК 293-EBNA1 (клон 6E) (Yves Durocher, NRC Canada) наращивали до 2×10^6 клеток/мл в 2 л сред F17 в мешке GE Healthcare Wave объемом 10 л при 37°C, 5% CO₂, и смешивали покачиванием под углом 8 градусов при 18 оборотах в минуту.

ДНК получали для трансфекции следующим образом: среды F17 нагревали до 37°C. ДНК и реагент для трансфекции PEI оттаивали в стерильном биобезопасном ламинаре. ДНК (2,25 мг) добавляли к подогретым средам F17 объемом 100 мл в стерильной полипропиленовой культуральной колбе и осторожно смешивали путем вращения. В отдельной колбе 6,75 мг PEI (1 мг/мл) комбинировали с 100 мл подогретых сред F17 и осторожно смешивали путем вращения. Колбы оставляли на 5 минут перед объединением содержимого путем добавления раствора PEI в колбу, содержащую ДНК, и осторожно перемешивали путем вращения.

Содержимое колбы, содержащей смесь ДНК:PEI добавляли к одноразовому биореактору, содержащему клетки НЕК 293-6Е после инкубации при комнатной температуре в течение 15 минут в биобезопасном ламинаре. Мешок, содержащий трансфицированные клетки НЕК 293-6Е, инкубировали в течение двадцати четырех часов при 37°C, 5% CO₂, и смешивали покачиванием под углом 8 градусов при 18 оборотах в минуту. Через 24 часа 100 мл стерильного отфильтрованного 20% Триптона N1 (Organotechnie, Canada), растворенного в средах F17, асептически добавляли к культуре. Клетки и среды собирали после дополнительных 72 часов инкубации, как описано выше. Альтернативно, временная экспрессия НЕК во встряхиваемых колбах (0,5 л сред в 2-литровой колбе) может быть выполнена с соотношением ДНК:PEI, равным 1:2. Клетки отделяли от кондиционированных сред путем центрифугирования при 6000g в течение 30 минут при 4°C. Кондиционированные среды сохраняли, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и хранили при 4°C.

Кондиционированные среды наносили на хроматографическую колонку объемом 10 мл, содержащую смолу MabSelect Sure, предварительно уравновешенную в PBS при скорости 5 мл/мин. После загрузки отфильтрованных кондиционированных сред, колонку промывали по меньшей мере 100 мл PBS при комнатной температуре.

Очищенный продукт элюировали из колонки с применением 100 мМ глицина/100 мМ NaCl, pH 3,0. Фракции нейтрализовали в pH либо путем сбора в пробирки, содержащие 1/6 объема 1 М Трис pH 8, либо путем объединения в соответствии с поглощением при A280 с последующим добавлением 1М Трис, pH 8 до 100 мм. Если содержание высокомолекулярных видов было больше, чем 5% после элюирования белка А, то образец дополнительно очищали с помощью колонки Superdex 200 (26/60) (GE Healthcare) в PBS. Фракции SEC, содержащие мономеры, объединяли и концентрировали. Полученный белок А или пул SEC тщательно диализировали против PBS при 4°C и стерильно фильтровали с использованием 0,22 мкм отсекающего фильтра перед замораживанием при -80°C.

Производство нерасфасованной продукции: экспрессия и первичное восстановление млекопитающих: система UCOE CHO

Банк клеток млекопитающих для исследований (RCB) был создан путем трансфекции слияний антимиостатинового аднектина-FC, клонированного в вектор pUCOE, содержащий универсальный хроматинраскрывающий элемент (UCOE) [модифицированный вектор UCOE из Millipore] в CHO-S-клетки. RCB создавали путем наращивания клеток в селективных средах (0,04% (объем/объем) L-глутамин (Invitrogen) и 0,01% (об/об) дополнения HT (Invitrogen) в среде CD-CHO (Invitrogen)), содержащей 12,5 мкг/мл пурамицина. Количество клеток кратковременного пассирования асептически выделяли центрифугированием, ресуспендировали в банковских средах (0,04% (объем/объем) L-глутамин (Invitrogen), 0,01% (объем/объем) дополнение HT (Invitrogen) и 7,5% (об/об) ДМСО в среде CD-CHO (Invitrogen)) до конечной концентрации 1×10^7 клеток/мл. Эти клетки первоначально замораживали в бане с 70% изопропиловым спиртом при -80°C в течение ночи и затем на следующий день переносили в жидкий азот для длительного хранения.

Клеточную культуру инициировали оттаиванием в одном флаконе RCB в селективной среде объемом 25 мл, содержащей 12,5 мкг/мл пурамицина, и наращиванием культуры в тех же средах. Клеткам позволяли достичь концентрации от $1-2 \times 10^6$ клеток/мл, прежде чем разделить обратно до $0,2 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки, как правило, поддерживали от 2 до 4 недель до посева биореактора. Нарощенную культуру пассировали в последний раз и позволяли вырасти до такой степени, чтобы биореактор объемом 15 л, содержащий 8 л сред производства (Invitrogen среды CD-CHO, содержащие 0,01% (об/об) дополнения HT (Invitrogen), 0,04% (об/об) Glutamax (Gibco) и 0,005% (об/об) Pluronic F-68 (фирма Gibco)), мог быть заполнен до конечной

концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл. Биореакторную культуру контролировали ежедневно на VCD (жизнеспособную плотность клеток), процент жизнеспособности, pH и концентрацию глюкозы. Биореакторную культуру кормили на 3 и 6 дни с добавлением 10% общего объема питательных сред. Культуру собирали между 7-м и 9-м днем с процентом жизнеспособности $> 70\%$. В процессе культивирования биореакторную культуру поддерживали при pH 7,1, температуре 37°C , % DO2 40% и постоянной RPM 100.

В день сбора биореакторную культуру пропускали непосредственно через объемный фильтр 6,0/3,0 мкм с последующей стерильной 0,8/0,2 мкм фильтрацией в стерильный пакет. Очищенную стерильную культуру хранили в течение ночи при $2-8^\circ\text{C}$. Очищенную культуру затем концентрировали с помощью пластины TFF с использованием мембраны 30000 кДа. Приблизительная концентрация составляла 6-кратную, в зависимости от собранного титра. Концентрированный супернатант затем стерильно фильтровали в бутылках PETG и либо непосредственно обрабатывали, либо хранили при -80°C .

Очистка слияния антимюстатин-аднектин-Fc

Собранный культуральный супернатант (в чистом виде или концентрированный) загружают на колонку MabSelect белок A, предварительно уравновешенную PBS. Колонку промывают с 5CV 50 mM Трис pH 8,0, 1 M мочевины, 10% PG. Слияние аднектин-Fc элюируют с 100 mM глицина, pH 3,3, собирая пик в контейнер, который ранее заряжен с 1CV 200 mM ацетата натрия pH 4,5. Пик элюции основан на поглощении при A280.

Элюирование белка A разбавляют до pH 3,0 с добавлением 2 M лимонной кислоты и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа для инактивации вирусов. Образец затем разбавляют 200 mM трехосновного фосфата натрия до достижения pH 4,5. При необходимости раствор дополнительно разбавляют водой, чтобы снизить проводимость ниже 10 мс/см.

Разбавленное элюирование белка A пропускают через Tosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience), предварительно кондиционированный 50 mM ацетата натрия pH 4,5, в отрицательном режиме захвата. Проточный пик собирают на основании поглощения при A280. Колонку промывают 50 mM ацетата натрия и десорбируют 0,2 N NaOH.

Проточную AR Q 600C составляют с использованием тангенциальной проточной фильтрации, использующей 30K NMWCO мембрану из полого волокна (GE) с очень нежным смешиванием концентрата. Слияние аднектин-Fc диафильтруют в 25 mM

фосфата натрия 150 мМ Трегалоза pH 7,0 в течение 6 объемов и затем концентрируют до концентрации белка-мишени.

Пример 2 - Биофизическая оценка антимиостатиновых белков

Эксклюзионная хроматография: Стандартную эксклюзионную хроматографию (SEC) проводили на кандидатных аднектинах, получающихся в результате процесса в середине шкалы. SEC материала середины шкалы проводили с использованием колонки Superdex 200 10/30 или на колонке Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) на системе Agilent 1100 или 1200 HPLC с УФ-обнаружением при A214 нм и A280 нм и с флуоресцентной детекцией (возбуждение 280 нм, излучение 350 нм). Буфер 100 мМ сульфата натрия/100 мМ фосфата натрия/150 мМ хлорида натрия, pH 6,8 использовали в соответствующей скорости потока на используемой колонке SEC. Гель-фильтрационные стандарты (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) использовали для калибровки молекулярной массы. Результаты SEC на очищенных аднектинах середины шкалы показали преимущественно мономерный аднектин и элюирование в диапазоне приблизительно от 10 кДа против глобулярных стандартов гель-фильтрации (BioRad), как показано в таблицах 9 и 10.

Термостабильность: Анализ термической сканирующей флуоресценции (TSF) аднектинов НТПР проводили для экранирования их относительной термической стабильности. Образцы нормализовали до 0,2 мг/мл в PBS. 1 мкл красителя Sypro оранжевого, разбавленного 1:40 с PBS, добавляли к 25 мкл каждого образца, и планшеты упаковывали с чистой заклеивающейся пленкой для 96 луночных микропланшетов. Образцы сканировали с использованием машины BioRad RT-PCR путем плавного перехода температуры от 25°C до 95°C, со скоростью 2 градуса в минуту. Данные анализировали с использованием программного обеспечения BioRad CFX manager 2.0. Было показано, что значения T_h , полученные с помощью TSF, хорошо коррелируют со значениями T_m , полученными с помощью DSC в интервале плавления от 40°C до 70°C. Это считается приемлемым рабочим диапазоном для этой техники. Результат ND ("Нет данных") получается, когда наклон кривой перехода слишком мал, чтобы позволить отличить его производный пик (скорость изменения флуоресценции с течением времени) от шума. Результат "ND" не может быть истолкован как указание термостабильности. Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) диализованных НТПР'd и аднектинов середины шкалы проводили для определения их соответствующих T_m . Раствор 0,5 мг/мл сканировали в VP-капиллярном дифференциальном сканирующем калориметре (GE

Micgocal) путем плавного изменения температуры от 15°C до 110°C со скоростью 1 градус в минуту под давлением 70 p.s.i. Данные анализировали в сравнении с контрольным запуском соответствующего буфера с использованием наиболее подходящего программного обеспечения Origin (OriginLab Corp). Результаты анализов TSF и p.s.i обобщены в таблицах 8-10. Как показано в таблицах 8-10, многие из клонов проявляли температуры разворачивания свыше 60°C, что указывает на высокую биофизически стабильную структуру, подходящую для лекарственного состава. Аднектины, как правило, были толерантны к пегилированию или Fc-форматированию без видимой потери в стабильности. В некоторых случаях эти форматы получали улучшенную стабильность. Например, 3116_A07 в качестве немодифицированного аднектина характеризуется Tm по TSF 60°C, но при пегилировании (ATI-1377) Tm по DSC составлял 68°C, а в формате Fc-X (PRD-1286) Tm по DSC составлял 66°C.

Пример 3 – Основанный на клетках люциферазный анализ

Люциферазную репортерную плазмиду, реагирующий на активин элемент (ARE)-luc, получали путем лигирования девяти повторов ARE в тандеме к репортеру люциферазы светлячка. Плазмиду временно трансфицировали в клетки HepG2. Плазмиду pGL4.74[hRluc/TK] котрансфицировали для нормализации для эффективности трансфекции. 10000 клеток высевали на лунку в 96-луночный планшет. Когда такой белок, как миостатин, активин или BMP-11, добавляют к клеткам и он связывается с родственным рецептором, запускается последующая передача сигнала SMAD, приводя к связыванию фосфорилированного комплекса SMAD с ARE. Количество, например, миостатина, экспонированного на клетке, прямо пропорционально количеству продуцируемого белка люциферазы и, следовательно, измеренной активности люциферазы. Когда антагонист миостатина (например, антимиостатиновый аднектин) добавляют одновременно с миостатином к клеткам, активация ARE уменьшается, что приводит к снижению производства и активности люциферазы.

В этом эксперименте (1) антимиостатиновый аднектин и миостатин, (2) антимиостатиновый аднектин и активин А или (3) антимиостатиновый аднектин и BMP-11 предварительно инкубировали перед добавлением к клеткам. Миостатин (R&D Systems) использовали в концентрации 10-500 пМ, активин А (R&D Systems) в концентрации 10-500 пМ и BMP-11 (R&D Systems) в концентрации 10-500 пМ. После инкубации в течение ночи с этими различными комбинациями клетки лизировали и измеряли активность люциферазы (люминесценцию) с использованием Dual-Glo

Luciferase Assay System® (EnVision). IC₅₀ определяли как концентрацию аднектина, необходимую для достижения 50%-ного ингибирования индуцированной миостатином активности ARE-люциферазы.

Как показано в таблицах 8-10, антимиостатиновые аднектины ингибировали опосредованное миостатином увеличение ARE-luc репортерной активности.

Пример 4 - анализ связывания HTRF

Анализ HTRF использован для измерения аффинностей связывания антимиостатиновых аднектинов с миостатином. Анализ представлял собой конкурентный HTRF анализ с использованием метки Eu-W1024 в качестве донорного флуорофора и Alexa Fluor® 647 в качестве акцепторного флуорофора. Биотинилированный аднектин 1889E01 и меченый Alexa Fluor® 647 rhActRIIb-Fc может связываться с миостатином одновременно в двух различных сайтах связывания. Eu-W1024 меченый стрептавидин используется для связывания биотинилированного 1889E01. Два флуорофора, Eu-W1024 и Alexa Fluor® 647, принимают участие в образовании комплекса 1889E01/миостатин/ActRIIb-Fc, а сигнал HTRF можно прочесть на планшетном ридере Envision (Perkin Elmer) с использованием протокола HTRF. При наличии конкурентного аднектина сигнал HTRF уменьшается. IC₅₀ представлены в таблицах 8-10.

Таблица 8: Биофизическая характеристика, результаты ARE-люциферазного репортерного анализа и анализа HTRF связывания для антимиостатиновых моноаднектинов.

ID	T _m - TSF	T _m -DSC	ARE-люциферазный анализ			HTRF
			IC ₅₀ мио (нМ)	IC ₅₀ BMP-11 (нМ)	IC ₅₀ активина A (нМ)	IC ₅₀ мио (нМ)
1979_B06		48	0,11	3,3	194	ND
2062_G02		48	205	1500	>1500	ND
2522_C09	40		0,06	1,6	1000	ND
2523_G06	49	49	4,2	46	>2000	ND
2524_C11	ND	55	0,1	0,89	765	ND
2524_D09	54	49	0,06	0,55	84	ND
2524_E10	ND		0,09	5,6	>1000	ND
2524_H05	40		0,09	7,3	>1000	ND
2524_H11	49		0,03	6,2	>1000	ND
2525_B01	ND		0,11	3,2	73	ND
2525_D02	58	55	0,05	1,1	345	ND
2525_D05	ND	69	0,11	3,9	>1000	ND
2525_F07	46		0,13	3,4	>1000	ND

ID	Tm - TSF	Tm-DSC	ARE-люциферазный анализ			HTRF
			IC50 мио (нМ)	IC50 BMP-11 (нМ)	IC50 активина А (нМ)	IC50 мио (нМ)
2987_A06		50	0,10	23	283	ND
2987_B04		48	0,12	3,3	239	ND
2987_B09		52	0,01	0,92	172	ND
2987_C02		50	0,06	7,1	464	ND
2987_D05		49	0,11	2,4	2000	ND
2987_E03		51	0,10	2,3	224	ND
2987_E08		52	0,05	2,8	352	ND
2987_F01		49	0,05	6,5	594	ND
2987_F06		52	0,08	20	538	ND
2987_G04		49	0,09	3,3	171	ND
2987_G09		54	0,05	0,91	>2000	ND
2987_H02		51	0,05	11	794	ND
2987_H07		57	0,02	5,5	>400	ND
3006_A10	62		0,08	2,0	>2000	0,15
3007_B08	57		0,06	0,23	423	0,14
3007_C09	63		0,04	0,89	417	0,14
3007_C10	66		0,03	1,0	>2000	0,14
3008_A03	59		0,11	22,6	>2000	0,22
3008_B08	57		0,35	9,3	254	0,37
3008_D04	56		0,09	1,2	720	0,14
3008_F01	63		0,08	0,12	>2000	0,21
3008_G01	57		0,03	0,31	>2000	0,11
3008_G03	58		0,09	1,3	>2000	0,13
3115_D04	64		0,16	3,6	>1000	0,20
3115_E06	62		0,07	2,0	>1000	0,14
3116_A06	64		0,14	13	>1000	0,15
3116_A07	60		0,04	0,5	>1000	0,11
3116_C01	60		0,10	6,7	1000	0,35
3116_C06	61		0,14	8,9	>1000	0,18
3116_H06	60		0,10	1,6	>1000	0,13
3146_A08	69		0,70	48	>1000	0,26
ATI-1267		60	0,06	0,50	644	0,12
ATI-1275		53	0,03	0,14	19	0,19
ATI-1277		нет перехода	0,14	1,18	2000	0,38
ATI-1340		54	0,05	4,87	324	0,16

Таблица 9: Биофизическая характеристика, результаты ARE-люциферазного репортерного анализа и анализа HTRF связывания для пегилированных антимиостатиновых аднектинов.

ID	Tm - TSF	Tm-DSC	ARE-люциферазный анализ			HTRF
			IC50 мио (нМ)	IC50 BMP-11 (нМ)	IC50 активина А (нМ)	IC50 мио (нМ)

ID	Tm - TSF	Tm- DSC	% мономеров (SEC)	IC50 мю (нМ)	IC50 BMP- 11 (нМ)	IC50 активина А (нМ)	IC50 мю (нМ)
ATI-1106				177	1414	>2000	
ATI-1107		63	98	19	888	>2000	ND
ATI-1266		60	97,8	0,12	0,89	2000	0,21
ATI-1276		56	94,6	0,08	0,15	110	0,28
ATI-1278		46	93,7	0,27	1,1	>2000	0,54
ATI-1338		59		0,28	5,8	>1000	0,24
ATI-1339		61		0,28	6,0	>1000	0,28
ATI-1341		53		0,03	0,14	14	0,13
ATI-1359		57	96,5	0,26	3,1	>1000	0,36
ATI-1375		67	>99	0,17	1,6	>1000	0,76
ATI-1376		70	>99	0,03	0,83	>1000	0,32
ATI-1377		68	>99	0,05	0,78	>1000	0,15
ATI-1378		74	>99	0,29	5,4	>1000	1,29
ATI-1379		69	>99	0,10	4,3	>1000	0,28

Таблица 10: Биофизическая характеристика, результаты ARE-люциферазного репортерного анализа и анализа HTRF связывания для Fc-слитых антимиостатиновых аднектинов.

ID	Tm - TSF	Tm- DSC	% мономеров (SEC)	ARE-люциферазный анализ			HTRF
				IC50 мю (нМ)	IC50 BMP- 11 (нМ)	IC50 активина А (нМ)	IC50 мю (нМ)
PRD-932				0,24	ND	ND	ND
PRD-1171				0,08	0,20	19	0,14
PRD-1173				0,02	0,10	6	0,12
PRD-1174		Tm1 61 Tm2 67 Tm3 83		0,04	0,10	4	0,09
PRD-1175				0,10	0,28	19	0,15
PRD-1177				0,16	0,28	21	0,64
PRD-1178		Tm1 60 Tm2 69 Tm3 84		0,08	0,25	16	0,27
PRD-1180		Tm1 68 Tm2 83		0,07	0,11	14	0,13
PRD-1284				0,02	0,04	44	0,62
PRD-1285		Tm1 67 Tm2 68 Tm3 80	97	0,05	0,03	216	0,49

ID	Tm - TSF	Tm- DSC	° мономеров (SEC)	ARE-люциферазный анализ			HTRF
				IC50 мио (нМ)	IC50 BMP- 11 (нМ)	IC50 активина А (нМ)	IC50 мио (нМ)
PRD-1286		Tm1 66 Tm2 68 Tm3 81	99	0,10	0,11	94	0,73
PRD-1287				0,30	0,80	>1000	2,70
PRD-1288		Tm1 65 Tm2 69 Tm3 81	93	0,08	0,10	>1000	0,47
PRD-1301				0,06	0,06	15	0,07
PRD-1302				0,03	0,02	14	0,12
PRD-1303				0,02	0,03	314	0,11
PRD-1304				0,05	0,07	45	0,24
PRD-1305				0,06	0,07	113	0,10
PRD-1471		Tm1 62 Tm2 68 Tm3 81	99	0,16	0,16	60	0,47
PRD-1472		Tm1 62 Tm2 69 Tm3 80	100	0,07	0,05	1000	0,41
PRD-1473		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,07	0,06	125	0,73
PRD-1474		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0,08	0,09	>1000	0,45

Пример 5 - Опосредованное антимиостатиновым аднектином ингибирование индуцированного миостатином SMAD2 фосфорилирования

Человеческие клетки рабдомиосаркомы RH41 (DSMZ, Braunschweig, Germany) использовали для описанного ниже 12-, 2- и 4-точечного анализа реакции ингибирования. Клетки удаляли из культуральной среды, промывали для удаления сыворотки и стабилизировали в содержащих БСА средах для анализа в течение 4 часов. Клетки снимали с колбы с использованием версена и переносили в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-дном по 5×10^5 клеток/лунку. Для 12-балльной реакции ингибирования к клеткам добавляли 100 пМ рекомбинантного

миостатина (R&D Systems), предварительно инкубированного в течение 1 часа с 5-кратным разведением диапазона концентраций аднектинов, начиная с 1000 нМ (т.е., 1000 нМ, 200 нМ, 40 нМ, 8 нМ, 1,6 нМ, 0,32 нМ, 0,064 нМ, 0,0128 нМ, 0,00256 нМ, 0,000512 нМ, 0,000102 нМ, 0,0000204 нМ). Для 4-балльной реакции ингибирования к клеткам добавляли 100 пМ миостатина, предварительно инкубированного в течение 1 часа с концентрационным диапазоном аднектинов (30 нМ, 3 нМ, 0,1 нМ или 0,001 нМ). Для 2-точечной реакции ингибирования к клеткам добавляли 100 пМ миостатина, предварительно инкубированного в течение 1 часа с концентрационным диапазоном аднектинов (10 нМ или 0,5 нМ). Клетки обрабатывали смесью миостатин-аднектин в течение 1 часа при 37°C, чтобы индуцировать SMAD2 фосфорилирование (pSmad2). Стимуляцию останавливали путем помещения клеток на лед и добавления ледяного PBS. Клетки осаждали и лизировали в соответствии со стандартными протоколами и SMAD2 фосфорилирование обнаруживали с использованием анализа ELISA (Cell Signaling Technologies). Ингибирование, достигаемое в диапазоне концентраций аднектинов, представляли графически с использованием программного обеспечения GraphPad Prism и нормализацией точек данных с контрольными, которые давали 100% и 0% ингибирование. IC50 определяли как концентрацию аднектина, необходимую для достижения 50%-ного ингибирования индуцированного миостатином SMAD2 фосфорилирования. Данные, представленные в таблице 11, указывают на то, что аднектины, полученные из оптимизации аффинности родительских клонов 1979_B06 и 2062_G02 оба мощно и полностью ингибировали индуцированное миостатином pSMAD фосфорилирование и демонстрировали значения IC50 в диапазоне от 0,78 нМ до 0,06 нМ. Это представляет собой более чем 16-75 кратное улучшение в значениях IC50, по сравнению с родительскими клонами 1979_B06 (IC50 = 12,8 нМ) и 2062_G02 (IC50 = 59,1 нМ).

Таблица 11. Ингибирование SMAD2 фосфорилирования (pSMAD2) антимиостатиновыми аднектинами

ID	Анализ pSmad2		
	IC50 мио (нМ) 12-точечный	IC50 мио (нМ) 4-точечный	% ингибирования мио при 10 нМ
1979_B06 (aka ATI-1133)	12,8±2,4		
2062_G02 (aka ATI-1134)	59,1±16,2		
2522_C09	0,13		

Анализ pSmad2			
ID	IC50 мио (нМ) 12-точечный	IC50 мио (нМ) 4-точечный	% ингибирования мио при 10 нМ
2523_G06	0,78		
2524_C11	0,14		
2524_D09	0,11		
2524_E10	0,13		
2524_H05	0,13		
2524_H11	0,11		
2525_B01	0,14		
2525_D02	0,36		
2525_D05	0,20		
2525_F07	0,27		
3006_A10			51
3007_B08			97
3007_C09			80
3007_C10			76
3008_A03			87
3008_B08			90
3008_D04			92
3008_F01			86
3008_G01			98
3008_G03			91
3115_D04		0,06	
3115_E06		0,06	
3116_A06		0,27	
3116_A07		0,06	
3116_C01		0,26	
3116_C06		0,73	
3116_H06		0,06	
3146_A08		0,78	

Пример 6 - Измерения аффинности SPR для антимииостатиновых аднектинов.

Кинетика связывания аднектина с использованием формата A SPR

Антитело к человеческому Fc (Biacore/GE) иммобилизовали на чипе Biacore CM5 через связь NHS/EDC в соответствии с инструкциями изготовителя. ActRIIB-Fc (R&D Systems) захватывали как на эталонных, так и активных проточных ячейках, с последующим захватом мииостатина человека (R&D Systems), BMP-11 человека (GDF-11, R&D Systems) или активина человека (R&D Systems) только на активных проточных ячейках (каждый солибилизованный в соответствии с предложенным производителем протоколом и разведенный в подвижном буфере HBSP). Диапазон концентраций антимииостатинового аднектина применяли ко всем проточным ячейкам

в проточном буфере HBSP. Регенерация поверхности чипа между циклами достигала с двумя 30 секундными импульсами 3М MgCl_2 . Кинетические кривые эталонно-вычтенных сенсограмм приспособляли к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biaevaluation. Сводные кинетические данные Biacore приведены в таблице 12.

Приведенные в таблице 12 данные указывают на то, что оптимизированные аднектины следующего поколения плотно связываются с миостатином с K_D в диапазоне 0,06-1,47 нМ, по сравнению с исходными аднектинами 1979_B06 и 2062_G02, которые демонстрировали K_D 29 и 49 нМ соответственно.

После пегилирования происходит некоторая потеря в миостатиновой аффинности с K_D от 0,76 до 14,4 нМ, хотя нет никакого эффекта пегилирования на активность в ARE-люциферазном анализе (смотрите таблицы 8 и 9).

Селективность аднектина по BMP-11 колеблется от полностью неселективного до 17-кратного, в то время как связывание с активином либо крайне слабое, либо отсутствует, предполагая высокую селективность по активину.

Кинетики связывания аднектина с использованием формата В SPR (применимого для Fc-форматированных аднектинов)

Миостатин человека (R&D Systems), BMP-11 человека (GDF-11, R&D Systems) или активин человека (R&D Systems) растворяли в соответствии с предложенным производителем протоколом и иммобилизовали на чипе CM5 Biacore при 1-10 мкг/мл в ацетатном буфере (pH 4,0 или 4,5), используя стандартное сцепление NHS/EDC. Диапазон концентраций антимиостатиновых аднектинов применяли в подвижном буфере HBSP. Регенерация поверхности чипа между циклами достигала с 60 секундами 10-50 мМ NaOH. Кинетические кривые эталонно-вычтенных сенсограмм приспособляли к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biaevaluation. Для Fc-форматированных аднектинов кинетика взаимодействия обусловлена авидностью двухвалентного Fc и димерного миостатина даже при низкой плотности иммобилизации. Сводные кинетические данные Biacore приведены в таблице 12. Приведенные в таблице 12 данные показывают, что некоторые из аднектинов, проходящие в этом формате SPR, связываются с миостатином и BMP-11, а также с активином с аналогичными аффинностями. Существенная селективность к активину в ARE-люциферазном анализе, однако, предполагает, что аффинность к активину может быть искусственно усилена в этом формате анализа SPR.

Таблица 12. Сводные кинетические данные SPR для антимиостатиновых аднектинов. Форматы А и В описаны в примере 6.

ID	KD мю (нМ)	KD BMP-11 (нМ)	KD активина А (нМ)	Формат
1979_B06 (aka ATI-1133)	29	489	нет связывания	А, 25С
2062_G02 (aka ATI-1134)	48,8	697	нет связывания	А, 25С
2522_C09	0,51	0,45	нет/ слабое связывание	А, 25С
2523_G06	1,465	10,65	нет связывания	А, 25С
2524_C11	0,62	0,67	нет связывания	А, 25С
2524_D09	0,64	0,81	слабое связывание	А, 25С
2524_E10	1,34	1,42	нет связывания	А, 25С
2524_H05	0,88	0,87	слабое связывание	А, 25С
2524_H11	1,12	1,22	нет связывания	А, 25С
2525_B01	1,29	1,58	слабое связывание	А, 25С
2525_D02	0,24	0,30	нет/ слабое связывание	А, 25С
2525_D05	1,28	1,99	нет связывания	А, 25С
2525_F07	0,79	0,97	нет/ слабое связывание	А, 25С
2987_H07	0,99	2,25	слабое связывание	А, 25С
ATI-1267	0,057	0,065	слабое связывание	А, 25С
ATI-1275	0,15	0,15	слабое связывание	А, 25С
ATI-1277	0,16	0,14	слабое связывание	А, 25С
ATI-1107	128	~300	нет связывания	А, 25С
ATI-1266	0,76	2,57	слабое связывание	А, 25С
ATI-1276	4,18	8,8	нет связывания	А, 25С
ATI-1278	6,04	3,3	нет связывания	А, 25С
ATI-1338	1,9	3,8	4,6	В, 37С
ATI-1339	3,6	6,9	6,5	В, 37С
ATI-1359	7,9	35,45	слабое связывание	А, 25С
ATI-1375	12,6	33,2	слабое связывание	А, 25С
ATI-1376	8,21	13,4	слабое связывание	А, 25С
ATI-1377	8,21	14,2	слабое связывание	А, 25С
ATI-1378	14,4	59,6	слабое связывание	А, 25С
ATI-1379	9,5	21,6	слабое связывание	А, 25С
PRD-932	1,43	ND	ND	В, 25С
PRD-1474 (aka ATI-1465)	0,59	ND	ND	В, 37С

Пример 7 – Жидкофазная аффинность для антимиостатиновых аднектинов

Аффинность в растворе PRD-1474, Fc-слитого антимиостатинового аднектина к миостатину измеряли с использованием анализа кинетического исключения (KinExA). Повторяющиеся четыре раза титрования PRD-1474 выполняли с миостатином при концентрации мономера 2 нМ (n = 2), 1 нМ (n = 1) и 0,7 нМ (n = 1). Относительную

концентрацию несвязанного миостатина измеряли с помощью захвата на твердой матрице ATI-1310 (соединенной с полиакриламидными гранулами с помощью сконструированного свободного цистеина) с последующим обнаружением с флуоресцентно меченым конструктором миостатинового корцептора, ActRIB-Ig, который может связываться с миостатином одновременно с аднектином. ATI-1310 родственник аднектину, который конкурирует с PRD-1474 за связывание с миостатином и позволяет захват несвязанного миостатина. Глобальный анализ Kd, приведенный в таблице 13, дает Kd 170 пМ с 95% доверительным интервалом 330-60 пМ. Аффинности PRD-1177 и ATI-1338 также измеряли с использованием того же формата анализа. Троекратные титрования PRD-1177 выполняли с миостатином при концентрации мономера 1 нМ (n=2) и 0,8 нМ (n=1). Троекратные титрования ATI-1338 выполняли с миостатином при концентрации мономера 5 нМ (n=1), 1,6 нМ (n=1) и 1,4 нМ (n=1). Эти анализы указывают на то, что PRD-1177 связывается с миостатином с глобальным значением Kd 250 пМ и 95% доверительным интервалом 340-130 пМ (таблица 13). ATI-1338 связывается с миостатином с глобальным значением Kd 850 пМ и 95% доверительным интервалом 1400-330 пМ.

Таблица 13. Измерения с помощью KinExA жидкофазной аффинности к связывающему миостатину.

Аднектин	Kd	95% доверительный интервал:	
		Kd высокая	Kd низкая
PRD-1474	170 пМ	330 пМ	60 пМ
PRD-1177	250 пМ	340 пМ	130 пМ
ATI-1338	850 пМ	1400 пМ	330 пМ

Пример 8 - Мутационный анализ 3116_A06

Для того чтобы понять относительную толерантность положений петли к мутациями, проведены два аналогичных, но отдельных исследования. Первое представляло собой традиционное аланиновое сканирование, где связывание и эффективность отдельных аланиновых мутаций в петлях аднектина 3116_A06 (SEQ ID NO: 118) оценивали в биохимических и основанных на клетках анализах. Второе исследование представляло собой глубокое мутационное сканирование, в котором авторы настоящего изобретения создали библиотеку моносайтовых мутаций в одинаковых положениях 3116_A06 (SEQ ID 118), но с замещенным каждым положением на 20 возможных аминокислот. Эти компоненты библиотеки затем экспрессировали как

слияния белок-мРНК и подвергали одному раунду дисплея мРНК (как описано в разделе IV), разделяя компоненты библиотеки, связанные с биотинилированным миостатином от тех, кто остался несвязанным, с использованием стрептавидиновых магнитных гранул. В этом подходе секвенирование следующего поколения вводных и связанных поколений позволяло определение относительного обогащения/обеднения каждой последовательности, отражая их внутреннюю аффинность к миостатину.

Аланиновое сканирование: сайт-направленный мутагенез ПЦР использовали для создания моносайтовых аланиновых мутаций в 3116_A06 (SEQ ID NO: 118) в петле BC (остатки 25-33), петли DE (остатки 55-58) и петли FG (остатки 80-89). Клоны экспрессировали в *E.coli* и очищали с помощью HTPP, как описано в примере 1. Эксклюзионная хроматография (SEC, как описано в примере 2) подтвердила, что все аланин-замещенные белки представляли собой преимущественно мономерные (таблица 14). Проводили как ARE-люциферазный (пример 3), так и HTRF анализы (пример 4). В анализе конкурентного связывания HTRF активности варьировали в диапазоне от $IC_{50} = 1,5 \text{ нМ}$ до $> 100 \text{ нМ}$ (таблица 14). Большинство положений переносили аланиновое замещение в анализе HTRF в некоторой степени, за исключением Gly55, Arg56 и Gly57 петли DE, для которых связывание было значительно меньше ($IC_{50} > 100 \text{ нМ}$). Меньший эффект происходил в положениях Gly30 петли BC и Val80, Thr81 и Tyr88 петли FG, которые все еще показывали связывание, но с > 10 -кратным увеличением IC_{50} , по отношению к исходной последовательности ("WT"). В ARE-люциферазном основанном на клетках анализе активность мутантов варьировала в диапазоне от $IC_{50} = 0,6 \text{ нМ}$ до $> 100 \text{ нМ}$ (таблица 14). Эффект аланиновых мутаций в целом был больше в основанном на клетках анализе по отношению к анализу HTRF. Gly55, Arg56 и Gly57 петли DE и Val80 и Tyr88 петли FG все отображают резкое снижение активности в данном анализе, с $IC_{50} > 100 \text{ нМ}$. Более умеренный эффект наблюдался для положений BC Leu26, Pro27, His28, Gly30 и Asn33 и положений FG Thr81, Tyr85 и Leu86, все из которых характеризовались $IC_{50} > 10$ -кратным, чем исходная последовательность.

Таблица 14: Биохимическая характеристика и основанные на клетках активности аланиновых мутантов 3116_A06

	Мутация	SEC*	HTRF миостатина	ARE-люц. миостатина

			IC50 (нМ)	IC50 (нМ)
	исходн. WT	1	0,3	0,6
BC	S25A	1	0,8	2,9
	L26A	1	2,3	16
	P27A	1	1,0	10
	H28A	1	0,8	6,2
	Q29A	1	0,7	1,5
	G30A	2	5,1	40
	K31A	1	0,6	2,2
	N33A	1	2,0	9,8
DE	G55A	2	>100	>100
	R56A	1	55	>100
	G57A	1	>100	>100
	V58A	2	1,6	3,3
FG	V80A	1	4,0	>100
	T81A	1	4,9	32
	D82A	1	0,8	1,8
	T83A	1	1,3	1,8
	G84A	1	2,0	3,6
	Y85A	1	2,0	5,5
	L86A	2	1,4	12
	K87A	1	0,8	2,0
	Y88A	1	11	>100
	K89A	1	0,7	1,6

* SEC 1: высокомономерный; SEC 2: в основном мономерный

Глубокое мутационное сканирование: Высокопроизводительное секвенирование комбинировали с дисплеем белка, чтобы позволить одновременное измерение относительной пригодности каждого возможного моносайтового мутанта петли, в масштабе, который был бы обременительным для традиционного подхода, как описано выше (для обзора подходов "Глубокого мутационного сканирования",

смотрите Araya et al., *Trends in Biotechnology* 29: 435-442, 2011; сходный подход дополнительно проиллюстрирован в Forsyth et al., *mAbs* 5: 523-532, 2013).

Конструирование и выбор библиотеки: Создавали три отдельные библиотеки, которые содержали каждую возможную моносайтовую мутацию в каждой из трех петель 3116_A06 (SEQ ID NO: 118): петля BC (положения 25-33), петля DE (положения 55-58) и петля FG (положения 80-89). Для каждой петли разрабатывали несколько олигонуклеотидов, которые по отдельности включали в кодон NNK в каждом положении, где N=A, C, G, T и K=G, T. Использование этих вырожденных кодонов позволяет кодирование всех 20 аминокислот (плюс стоп-кодон) в положение, в котором NNK включен. Олигонуклеотиды собирали с помощью расширения перекрытия ПЦР, чтобы создать библиотеки полноразмерных аднектинов, где Lib-BC, содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли BC 3116_A06, Lib-DE содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли DE 3116_A06 и Lib-FG содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли FG 3116_A06. Экспрессировали три библиотеки как молекул слияний мРНК-белок с использованием PROfusion в соответствии с Xu et al., *Chemistry & Biology* 9: 933-942, 2002. Молекулы PROfusion Lib-BC, Lib-DE и Lib-FG отдельно выбирали против 3 нМ биотинилированного миостатина, и связывающие молекулы впоследствии захватывали на стрептавидиновых магнитных гранулах. Связывающие элюировали из гранул с использованием 100 mM KOH. Молекулы, элюированные из гранул, представляют собой варианты 3116_A06, которые все еще могут связываться с миостатином, в то время как те, которые присутствуют в исходной библиотеке, но не найдены в элюции, представляют собой варианты 3116_A06, которые не связываются с миостатином.

Штрихкодирование и смешивание NGS: Две популяции, входную (до миостатинового связывания) и связующую (элюированную из гранул после отбора), полученные из каждой из трех библиотек (Lib-BC, Lib-DE и FG-Lib), собирали и амплифицировали отдельно. Каждой популяции прикрепляли универсальный адаптор 5'-TruSeq, адаптор II 3'-Truseq и уникальный 6-нуклеотидный штрих-код с помощью ПЦР. В общей сложности шесть популяций со штрих-кодами затем по отдельности количественно определяли и смешивали (Lib-BC: Lib-DE: Lib-FG = 9:4:10) на основании количества рандомизированных остатков в каждой петле, с тем чтобы получить одинаковое число последовательностей на статистически рандомизированные положения.

Объединенный образец подвергали секвенированию с помощью секвенирования следующего поколения с 150 п.н. с двух концов MiSeq (Illumina).

Анализ данных NGS: Прямочитаемые последовательности из секвенирования следующего поколения группировали в зависимости от популяции, положения мутации и идентичности мутировавшей аминокислоты. Все последовательности плохого качества и содержащие множественные сайты мутации исключали из анализа. Далее, частоту каждой последовательности в популяции после отбора разделяли на частоту во входной популяции для того, чтобы вывести коэффициент насыщения (ER). Сравнение ER исходных последовательностей (WT, который функционирует в качестве положительного контроля) и последовательностей, содержащих стоп-кодон (который функционирует в качестве отрицательного контроля, представляющего фоновый шум случайного выживания) показало, что отношение сигнала к фону (S/B) варьировало между тремя петлями, по-видимому, потому что каждая библиотека петли прошла через выборы в индивидуальном порядке. По этой причине, каждую последовательность нормализовали по средним стоп и средним wt ER для ее собственной специфической петли, чтобы получить ER^{norm} .

$$ER^{norm} = \frac{ER - ER_{stop}}{ER_{wt} - ER_{stop}}$$

Глубокое мутационное сканирование проверяли путем сравнения относительной пригодности моносайтовых аланиновых мутантов с биохимическими данными от традиционного аланинового сканирования. В целом, корреляция была довольно сильной (фиг. 8). ER NGS определяют профиль насыщения и истощения аланиновых мутантов через петли, которые хорошо коррелируют с эффектом, наблюдаемым в HTRF и ARE-люциферазном анализе.

IC50 биохимического HTRF также наносили непосредственно против NGS ER^{norm} для каждого аланинового мутанта, как показано на фиг. 9.

Основываясь на аланиновых корреляциях, были созданы три категории, в которые могли быть сгруппированы все моносайтовые аминокислотные мутации через их коэффициенты обогащения NGS: наиболее предпочтительные мутации ($ER^{norm} > 0,8$), более предпочтительные мутации ($ER^{norm} > 0,5$) и предпочтительные мутации ($ER^{norm} > 3$ стандартных отклонения от среднего ER_{stop} петли). Нижние пределы ER^{norm} , определяющие последнюю категорию, отличались для трех петель: BC = 0,25; DE = 0,15; FG = 0,35. Все моносайтовые мутанты в петлях 3116_A06 группировали в

соответствии с их нормализованными коэффициентами обогащения, чтобы определить относительную толерантность каждого положения к мутации (таблица 15).

Таблица 15: Моносайтовые мутации в последовательностях петель 3116_A06, поддерживающих связывание с миостатином

Положе- ние		Предпочтительные мутации	Более предпочтительные мутации	Наиболее предпочтительные мутации
25	X ₅₁	ACDFHIKLNQRSTVWY	CFISVWY	FSW
26	X ₅₂	LMV	L	L
27	X ₅₃	ACDEIKLMNPQRSTVY	P	P
28	X ₅₄	ACDEFGHIKLMNQRST VWY	CDEFGHIKLMNQRST VWY	CFGIKLMNRSTVWY
29	X ₅₅	ACDEFGHIKLMNPQRS TVWY	ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACEFHIKLMPQRSTV Y
30	X ₅₆	GS	G	G
31	X ₅₇	ACDEFGHIKLMNQRST VWY	ACGHIKLMNQRSVW Y	ACHKLMNRVWY
32	X ₅₈	ACGLMST	AGLMS	AGL
33	X ₅₉	ACFHNPQRSY	CHNQS	HNQ
55		G	G	G
56		R	R	R
57		G	G	G
58	X ₆₀	ACDEFIKLMNQSTV	CEILMQTV	CEILMV
80	X ₆₁	ACFILMQTVWY	ACILMV	IV
81	X ₆₂	ACFGHIKLMNQRSTVW Y	CFHILMQRSTVWY	CFILMTVWY
82	X ₆₃	ACDEFGHIKLMNPQRS TVWY	ACDEFGHILMNQST VWY	ACDEFGHILMNQSTV
83	X ₆₄	ACDEFGHIKLMNPQRS TVWY	ACDEFGHIKLMNQRS TVWY	ACDFGILMNQSTVWY
84	X ₆₅	ACDEFGHIKLMNQRST VWY	ADEFGHILMNQSTV WY	AGSTW
85	X ₆₆	ACFHILMNPSSTVWY	CFILMPTVWY	FIVWY
86	X ₆₇	ACEFHIKLMNQRSTVW Y	CFHIKLMNQRTVWY	FHILMVWY
87	X ₆₈	ACDEFGHIKLMNPQRS TVWY	ACEFGIKLMNPQRST VWY	ACFGIKLMTVW
88	X ₆₉	FWY	WY	WY
89	X ₇₀	ACDEFGHIKLMNPQRS TVWY	ACDEGHKLMNPQRS TV	AGKLMPQR

С использованием данных полного глубокого мутационного сканирования, положения 25, 26, 27, 30, 32 и 33 петли BC, положения 55, 56 и 57 петли DE и

положения 80 и 88 петли FG, кажутся наиболее сохраненными, когда только один или несколько типов аминокислот в этих положениях поддерживают связывание с миостатином. С другой стороны, другие положения представляют собой высоко устойчивые к мутации, включая в себя положения 28, 29 и 31 петли ВС и положения 82, 83 и 87 петли FG.

Пример 9 - Оценка фармакокинетики антимиостатиновых аднектинов

Для исследования фармакокинетического профиля аднектинов с различными форматами пегилирования, антимиостатиновый аднектин 2987_H07 форматировали с ПЭГ 40 KD (АТИ-1338) с 2 ветвями, ПЭГ 40 KD (АТИ-1339) с 4-мя ветвями и бис ПЭГ 20 KD (АТИ-1341). Одноразовые исследования подкожного введения с этими тремя пегилированными аднектинами проводили на мышах C57BL6. Общую концентрацию лекарственного средства определяли с помощью анализа ELISA. Биоаналитический РК иммуноанализ для количественного определения АТИ-1338 использовали в стандартном формате сэндвич анализа ELISA, в котором 1338 захватывали с моноклональным антителом к His-Tag белку, а затем обнаруживали с поликлональным антителом к ПЭГ. Как показано в таблице 16, два пегилированных формата КД 40, АТИ-1338 и АТИ-1339, включали более заметное фармакокинетическое повышение (т.е. более длинный период полужизни ($t_{1/2}$) и более высокое нормированное к дозе экспонирование), чем бис 20 КД пегилированный формат, АТИ-1341.

Таблица 16. Фармакокинетическое сравнение трех пегилированных форматов для аднектина 2987_H07

РК параметры	АТИ-1338	АТИ-1339	АТИ-1341
Доза (мг/кг)	5	3,9	4
С _{max} /Доза (нМ/(мг/кг))	547	370	113
Т _{max} (ч)	24	24	4
АUC/Доза (нМ*ч/(мг/кг))	32	23	2,1
t _{1/2} (ч)	25	31	16

Однодозовые исследования после внутривенного и подкожного введения Fc-слитых антимиостатиновых аднектинов (PRD-1177, PRD-1286 и PRD-1474) проводили у мышей C57BL6, чтобы оценить последствия Fc-слияния на фармакокинетические параметры. Общую концентрацию лекарственных средств определяли с помощью анализов ELISA. В биоаналитическом ПК иммуноанализе для количественного определения конъюгатов Fc для PRD1177, 1474 и 1286 использовали стандартный формат сэндвич анализа ELISA с использованием технологии ECL, где 1177 захватывали с поликлональными антителами к каркасному аднектину, затем обнаруживали с антителом к человеческому IgG. Как показано в таблице 17, все три Fc-слитые аднектина характеризовались более длительным периодом полураспада (58-172 ч), чем пегилированный аднектин ATI-1338 (25 ч). Более низкая биодоступность SC, вероятно, отражает протеолиз при интерстициальном и лимфатическом транзите биологической молекулы. Биодоступность SC Fc-слитых аднектинов находится в разумных пределах, основываясь на публикациях (например, Richter et al., *AAPS J.* 2012;14:559-70).

Таблица 17. Фармакокинетическое сравнение трех Fc-слитых антимиостатиновых аднектинов

ПК параметры	PRD-1177	PRD-1286	PRD-1474
Доза (мг/кг)	2	2	2
Выведение (мл/мин/кг)	0,017	0,016	0,014
Vdss (л/кг)	0,093	0,190	0,054
t _{1/2} (ч)	68	172	58
Биодоступность SC	60%	100%	94%

Пример 10 - Механизм ингибирования антимиостатиновых аднектинов

Конкурентный анализ ELISA: Конкурентные анализы связывания для оценки способности антимиостатиновых аднектинов конкурировать с рецептором ActRIIb, связывающимся с миостатином, проводили с использованием конкурентного анализа ELISA. Планшеты Nunc MaxiSorp покрывали 2 мкг/мл ActRIIb-Fc (R&D Systems) в 0,2

М буфере карбоната натрия pH 9,6 в течение ночи при 4°C. После отмывания PBS-T (PBS, содержащий 0,05% Твин-20), лунки блокировали буфером OptEIA (BD Biosciences) в течение 1 ч при 25°C при встряхивании. Миостатин (10 нМ, R&D Systems) предварительно инкубировали с диапазоном концентраций аднектина или конкурента ActRIIb-Fc (0,2 пМ до 1 мкМ) в буфере OptEIA в течение 1 ч при 25°C при встряхивании. Блокированный и покрытый аналитический планшет промывали PBS-T, и затем добавляли миостатиновые/конкурентные смеси и инкубировали в течение 30 мин при 25°C при встряхивании. Аналитический планшет промывали PBS-T, после чего связанный миостатин обнаруживали с 1:1000 биотинилированным козым поликлональным антителом к миостатину (R&D Systems), разбавленным в OptEIA, в течение 1 ч при 25°C при встряхивании. После отмывания с PBS-T добавляли 1:5000 стрептавидин-HRP (Thermo/Pierce), разведенный в OptEIA, с последующей инкубацией в течение 30 мин при 25°C при встряхивании. Аналитический планшет развивали с TMB (BD Biosciences), гасили 2N серной кислотой и поглощение считывали при A450. Как показано на фиг. 10, как и ожидалось, ActRIIb-Fc в растворе полностью блокирует связывание миостатина с ActRIIb-Fc, нанесенным на планшет. В отличие от этого, однако, PRD-1288 (отличается от PRD-1474 только в линкерной последовательности), PRD-1285 и PRD-1286 в концентрациях до 1 мкМ не блокируют миостатин от связывания с ActRIIb-Fc.

SPR конкуренция: Конкурентные анализы связывания для оценки способности антимиостатиновых аднектинов конкурировать с рецепторами Type I и Type II за связывание с миостатином или BMP11, как суррогата миостатина, также проводили с использованием SPR на приборе Biacore T100 в двух различных экспериментальных форматах. В "SPR формата A" поверхности сенсорного чипа подготавливали путем иммобилизации 100 мкг/мл белка A (Pierce) в 10 mM ацетата pH от 4,5 до 4500 RU на сенсорном чипе CM5 (Biacore/GE Healthcare) с использованием стандартной этил(диметиламинопропил)карбодииимидной (EDC)/N-гидроксисукцинимидной (NHS) химии с блокированием этаноламина. ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ActRIIb-Fc (собственного производства), моноклональное антитело к миостатину/BMP11 (mAb-A), которое конкурирует за связывание с миостатином с ActRIIb, но не конкурирует с 3116A06 за связывание с миостатином (собственного производства), или аднектин-Fc PRD-1474 в концентрациях 7-13 мкг/мл захватывали через хвост Fc к поверхностным плотностям 1600 - 4300 RU с использованием 60 сек введений при 10 мкл/мин. Сравнительные эксперименты выполняли с помощью

следующих 100 нМ миостатина (R&D Systems) или BMP11 (R&D Systems) на этих поверхностях в отсутствие или в присутствии 200 нМ аднектина ATI-1523 при скорости потока 30 мкл/мин с 180 сек ассоциации и диссоциации. Протекающий буфер для иммобилизации и сравнительных экспериментов представлял собой 10 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4, и поверхности регенерировали между циклами с использованием двух введений 10 мМ глицина, pH 1,5 в течение 30 с при 30 мкл/мин.

В SPR формата А BMP11 связывался специфически с поверхностями ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A и PRD-1474, в то время как миостатин связывался специфически с ActRIIB-Fc, mAb-A и PRD-1474, но не с ALK4-Fc или ALK5-Fc. Чтобы оценить влияние ATI-1523 на связывание миостатина или BMP11, связывающие реакции для каждого белка в конце фазы ассоциации 180 с нормализовали к 100% и сравнивали со связывающими реакциями для миостатина или BMP11 в присутствии ATI-1523 (таблица 18). ATI-1523 полностью блокировало связывание миостатина или BMP11 с контрольной поверхностью PRD-1474, как и ожидалось. В анализах для оценки способности ATI-1523 блокировать взаимодействие миостатина с ALK4-Fc или ALK5-Fc, BMP-11, который также связывается с ALK4-Fc и Fc-ALK5, использовали в качестве суррогата для миостатина, поскольку миостатин само по себе не связывался по существу с ALK4-Fc и ALK5-Fc в этом экспериментальном формате. ATI-1523 значительно снижал сигнал связывания для BMP11 к ALK4-Fc (снижение на 98%) и ALK5-Fc (снижение на 69%), что свидетельствует о том, что аднектин конкурирует за связывание с миостатином с рецепторами Type I. В отличие от этого, усиленная реакция связывания наблюдалась для комплексов миостатин/ATI-1523 или BMP11/ATI-1523 на поверхности ActRIIB-Fc или mAb-A, что свидетельствует о том, что комплексы миостатин/ATI-1523 или BMP11/ATI-1523 способны связываться с этими поверхностями, т.е. аднектин неконкурентоспособен с ActRIIB-Fc или mAb-A. Значительное увеличение в реакции связывания (> 1000% увеличение) для комплекса миостатин/ATI-1523 на поверхностях ActRIIB-Fc и mAb-A соответствует аднектину, характеризующемуся солюбилизирующим влиянием на миостатин.

Таблица 18: Реакция связывания SPR на 100 нМ миостатин или 100 нМ BMP11 в отсутствие или в присутствии 200 нМ ATI-1523 на поверхностях ALK4-Fc, ALK5-Fc, ActRIIB-Fc, mAb-A или PRD-1474.

Аналит	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-Fc	mAb-A	PRD-1474
Миостатин			100%	100%	100%
Миостатин + ATI-1523			1313%	1544%	-2%
BMP11	100%	100%	100%	100%	100%
BMP11 + ATI-1523	2%	31%	189%	258%	-1%

Конкуренция аднектина с использованием "SPR формата В": механизм действия антимиостатиновых аднектинов дополнительно оценивали в "SPR формата В", где миостатин или BMP11 (10 мкг/мл в 10 mM ацетата pH 4,5) непосредственно фиксировали на поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием химии связывания EDC/NHS до плотности 985 RU (миостатин) или 530 RU (BMP11). В настоящем документе реакцию связывания для рецепторов ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems) или мономера ActRIIB (произведенный своими силами), введенных в одиночку (2 мкМ в течение 180 с при 30 мкл/мин), сопоставляли с реакциями связывания для этих рецепторы после предварительного связывания слияния аднектин-Fc PRD-1474 с поверхностью (1 мкМ для 480 с при 30 мкл/мин). Подвижный буфер для иммобилизации и сравнительных экспериментов представлял собой 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4, и поверхности регенерировали между циклами с использованием 4 введений 50 mM NaOH в течение 15 с при 30 мкл/мин.

В отсутствие PRD-1474 каждый рецептор связывался специфически с иммобилизованным BMP11, тогда как только ALK5-Fc и мономер ActRIIB, но не ALK4-Fc, связывались с иммобилизованным миостатином. Предварительное связывание PRD-1474 значительно уменьшало сигнал связывания для ALK4-Fc по отношению к BMP11 (уменьшение на 70%), а также уменьшало связывание ALK5-Fc по отношению к миостатину или BMP11 (уменьшение на 35-41%), но характеризовалось минимальным эффектом на связывание мономера ActRIIB как миостатиновой, так и BMP11 поверхностью, таблица 19. Эти данные, взятые вместе с данными конкуренции SPR из "SPR формата А" (таблица 18), данными конкурентного анализа ELISA (фиг. 10) и полным ингибированием миостатиновой передачи сигналов, наблюдаемым в ARE-люциферазном анализе (фиг. 11), показывают, что аднектиновый механизм действия представляет собой блокаду вовлечения рецепторов передачи сигналов Type I (ALK4/5), и что аднектины не конкурируют со связыванием с рецепторами Type II (ActRIIB).

Таблица 19: Реакция связывания SPR для 1 мкМ ALK4-Fc, ALK5-Fc или мономера ActRIIb на иммобилизованной миостатиновой или BMP11 поверхностях с или без предварительно связанного PRD-1474.

Поверхность	Предварительное связывание PRD-1474	ALK4-Fc	ALK5-Fc	мономер ActRIIb
Миостатин	нет		100%	100%
	есть		55%	111%
BMP11	нет	100%	100%	100%
	есть	30%	65%	92%

Так как эти аднектины представляют собой семейства последовательностей, примеры которых приведены в настоящем изобретении, и индивидуальных клоны в рамках четко определенного семейства последовательностей сохраняют тот же сайт связывания, последовательности, покрытые настоящим изобретением, действуют путем блокирования вовлечения ALK4/5 в комплексе миостатин-ActRIIb.

Фармакокинетические данные дополнительно указывают на то, что содержание комплексов миостатина-аднектина со временем накапливается и что эти комплексы связываются с ActRIIb, таким образом действуя в качестве доминантного негативного ингибитора передачи сигналов, не зависимой от свободного лекарственного средства. Этот уникальный механизм отличает антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению от антител к миостатину, описанных в литературе (например, US 7632499), а также указывает на то, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению характеризуются увеличенной активностью.

Пример 11: Картирование сайта связывания аднектина на миостатине с использованием HDX-МС:

Сайт связывания аднектина на миостатином дополнительно оценивали с использованием водород-дейтериевой обменной масс-спектрометрии (HDX-MS).

Способ водород/дейтериевой обменной масс-спектрометрии (HDX-МС) исследует конформацию белка и конформационную динамику в растворе путем контроля скорости обмена дейтерия и степени в амидных атомах водорода остова. Уровень HDX зависит от растворимой доступности амидных атомов водорода остова и конформации белка. Увеличение массы белка при HDX может быть точно измерено с

помощью МС. Когда эту технику сочетают с ферментативным расщеплением, могут быть получены структурные особенности на уровне пептида, делая возможной дифференциацию экспонированных на поверхности пептидов сложенных внутри или из изолированных на границе белок-белкового комплекса. Как правило, выполняется мечение дейтерием и последующие эксперименты гашения с последующим расщеплением пепсином, разделением пептидов и анализом МС.

Поскольку было установлено, что один миостатин характеризуется недопустимо низкой растворимостью для HDX-МС в условиях, соответствующих физиологическому pH (<10 мкг/мл), авторы настоящего изобретения использовали альтернативную стратегию возрастающей миостатиновой растворимости с помощью комплексообразования белка с фрагментом Fab из mAb-A (Fab-A), которое, как было показано, не конкурирует с аднектином с использованием экспериментов SPR, описанных в примере 10. Олигомерное состояние образцов HDX-МС характеризовали с помощью эксклюзионной гель-хроматографии в сочетании с детектором рассеяния лазерного излучения в нескольких ракурсах (SEC-MALS), где определенная с помощью MALS масса комплекса миостатин/Fab-A (~ 120 кДа) согласовывалась с ожидаемой стехиометрией одного миостатинового гомодимера, связанного с двумя молекулами Fab-A, и определенная с помощью MALS масса комплекса миостатин/Fab-A/3116_A06 (142 кДа) согласовывалась с ожидаемой стехиометрией одного миостатинового гомодимера, связанного с двумя молекулами Fab-A плюс две молекулы 3116_A06.

До картирования сайт связывания аднектина на миостатине, распознаваемом аднектином 3116_A06 с помощью HDX-МС, проводились эксперименты без дейтерия, чтобы создать список общих пептических пептидов для миостатина от образцов миостатин/Fab-A (молярное соотношение 1:1 при 30 мкМ каждого) и миостатин/FAB-A/3116_A06 (молярное соотношение 1:1:1 при 30 мкМ каждого), достигая охвата последовательностей 83,5% для миостатина. В этом эксперименте 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) использовали во время стадии мечения с последующим добавлением гасящего буфера (200 мМ фосфатный буфер с 4М GdnCl и 0,5 М TCEP, pH 2,5, 1:1, об/об). Для экспериментов по картированию сайта связывания аднектина 5 мкл каждого образца (миостатин/Fab-A или миостатин/Fab-A/3116_A06) смешивали с 65 мкл буфера мечения HDX (10 мМ фосфатного буфера в D₂O, pH 7,0) для начала реакции мечения при комнатной температуре (~25°C). Реакцию проводили в течение различных периодов времени: 20 сек, 1 мин, 10 мин, 60 мин и 240 мин. К концу

каждого реакционного периода мечения реакцию гасили путем добавления гасящего буфера (1: 1, об/об) и погашенный образец вводили в систему Waters HDX-MS для анализа. Наблюдаемые общие пептические пептиды контролировали на уровне поглощения дейтерия в отсутствие/присутствии 3116_A06.

Экспериментальные данные, полученные из измерений HDX-МС указывают на то, что аднектин 3116_A06 распознает прерывистый сайт связывания аднектина, состоящий из двух пептидных областей в миостатине:

Область 1: LYFNGKEQIIYGKIPAM (85-101); SEQ ID NO: 329

Область 2: PHTHLVHQANP (56-66); SEQ ID NO: 330

На основании относительных уровней поглощения дейтерия две пептидные области могут быть классифицированы как область 1 > 2, с областью 1, характеризующейся самыми значительными изменениями в поглощении дейтерия.

Пример 12 - Стыковка аднектина 3116_A06 на миостатине *in silico*

Вычислительный подход использовали для создания структурной модели комплекса миостатина 3116_A06, которая согласуется с данными HDX-МС (фиг. 13). Белковую стыковку 3116_A06 в структуре человеческого миостатина (PDB 3HH2 взят из банка белковых данных, www.rcsb.org; Cash et al., *EMBO J.* 28:2662-2676, 2009) проводили с использованием ZDOCK (Chen and Wang, *Proteins* 47:281-294, 2002), реализованном в программном обеспечении Accelrys Discovery Studio v3.5 (Accelrys). Протокол ZDOCK использует стыковку твердого тела двух белковых структур (лиганд = 3116_A06 и рецептор = миостатин). Стыкованные ориентации фильтровали для комплексов, которые содержали конформации петель 3116_A06 FG (остатки от Thr79 до Tyr88) и BC (остатки от Ser25 до N33). Предпочтительный комплекс выбирали на основании комплементарности остатков границы в сочетании с корреляцией благоприятных замещений петель, идентифицированных с помощью мутагенеза аднектина. На фиг. 13А показан сайт связывания ALK4 и сайт связывания ActRIIB, картированный на структуре миостатина (серый). Область 1 и область 2, которые были идентифицированы с помощью экспериментов HDX-MS, как описано в примере 11, обозначены черным цветом. На фиг. 13В показан предпочтительный комплекс от стыковки с петлями BC, DE и FG 3116_A06 (черный) в виде стержневой визуализации, и области 1 и 2 миостатина (серый), представленные в виде заполненного пространства. Несколько остатков, которые идентифицировали в качестве благоприятных мутаций петель, показывают ключевые вклады. Например, в петле BC 3116_A06 остатки Ser25, Leu26 и Pro27 важны в качестве структурных

ограничений для поддержания общей конформации петли. В отличие от этого, Ala32 подходит для небольшой гидрофобной щели, образованной на границе комплекса, и остов остатка образует водородные связи с миостатином. Наиболее предпочтительные замены в положении 32 представляют собой Gly или Leu, и они, по прогнозам, также подходят вместо аланина. Сходным образом, Asn33 участвует в образовании водородных связей с близлежащими триптофановыми остатками миостатина. Наиболее предпочтительные замены в положении 33 представляют собой His и Gln, которые также содержат боковые цепи, которые могут вносить вклад в качестве доноров водородной связи. Остатки в петле DE характеризуются решающим значением: самые благоприятные замены ограничены Gly55, Arg56 и Gly 57, и только консервативные замены предпочтительны для Val58. В структуре модели Arg56 представляет собой критический остаток, вносящий вклад во взаимодействия пи-катионов с Y86 миостатина в области 1, а также дополнительные водородные связи с остовом и боковой цепью других остатков области 1. Для многих остатков петли FG наиболее предпочтительные замены представляли собой консервативные замены. Одно из важнейших идентифицированных положений представлял собой Tyr88, который характеризуется взаимодействиями пи-катионов и взаимодействиями пи-пи с Y55 и другими остатками из области 2 миостатина. Петля FG также участвует в нескольких гидрофобных взаимодействиях как с областью 1, так и с областью 2, идентифицированных из экспериментов по мутагенезу. Эти расчеты хорошо согласуются с экспериментальными данными HDX-MS и SPR.

Пример 13 - Мышиная модель мышечноскелетной эффективности *in vivo*

Мышей-самцов B6.SCID (9-13 недель, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) размещали в помещении с контролируемой температурой с обратным 12 часовым циклом свет/темнота. Вода и стандартная пища была доступна без ограничений. Мышей случайным образом рандомизировали и распределяли между группами лечения для получения либо контроля, либо исследуемых соединений согласно настоящему изобретению на основании веса (приблизительно 20-22 г). Для того чтобы продемонстрировать эффективность *in vivo* соединений согласно настоящему изобретению, соединения вводили либо еженедельно (Fc-слитые антимиостатиновые аднектины), либо два раза в неделю (пегилированные антимиостатиновые аднектины) путем подкожной инъекции. Исследуемые соединения вводили животным в фосфатно-солевом буфере (PBS). На контроли воздействовали только восстановительным буфером. Экспериментальным животным (n = 8-10

мышей/группу) вводили в течение 14 дней подкожно, например, с 5, 6 или 10 мг/кг/неделю соединения согласно настоящему изобретению. Измерения веса тела регистрировали перед рандомизацией, в день рандомизации и два-три раза в неделю в течение периодов лечения и в конце исследования. Массу мышц голени записывали в конце исследования с помощью анализа количественной магнитно-резонансной томографии (MPT, Echo Medical Systems, Техас). Опытные группы сравнивали с контрольной группой. Результаты показывают, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению увеличивали процент веса тела, по сравнению с исходным уровнем (фиг. 14) и характеризовались значительным анаболическим воздействием на объем скелетных мышц (фиг. 15), по сравнению с контрольными мышцами (например, приблизительно 7-10% увеличение объема мышц, по сравнению с контролем).

Магнитно-резонансная визуализация (MRI)

MRI для измерения объема мышц ног проводили на Bruker PharmaScan 4,7 Tesla с диаметром цилиндра 16 см (Bruker Biospin, Billerica, Ma. USA). Катушку объемом 62 мм использовали для передатчика и приемника. После сбора локализованных изображений голени, взвешенные изображения T2 получали с использованием плана осевого среза. Последовательность быстрое спин-эхо (RARE) состояла из 90° импульса Эрмита с последующим 180° импульсом Эрмита с TR/TE = 2000/23 мс. Одиннадцать осевых срезов собирали от верхней части колена до лодыжки с размером матрицы 256 x 128 точек данных. Поле зрения составляло 5 см на 2,5 см с толщиной среза 1,25 мм и фактором RARE 4 и 8 средних сигналов. Объемы мышц ног рассчитывали путем суммирования всех площадей осевых срезов, умноженных на толщину среза 1,25 мм для общего объема мышц в каждой ноге. Изображения анализировали как среднюю площадь представляющей интерес области (ROI) с помощью Image Sequence Analysis (ISA, Bruker Biospin, Billerica, Ma.). Ручной ROI очерчивал мышцы ног, исключая площадь кожи и подкожного жира. Общий средний объем мышц для обеих ног показан на фиг. 15.

MRI для объемов сердца как конечной точки безопасности также проводили с использованием того же сканера MRI. После получения первоначальных локализованных изображений грудной области, собирали 9 осевых изображений от больших сосудов в верхушке сердца. Как и в анализе мышц ног, осевые площади добавляли и умножали на толщину срезов 1,25 мм, чтобы получить общий объем

сердца для каждого животного. Никаких существенных изменений в объеме сердца не наблюдалось с помощью MRI.

Статистика

Различия между группами оценивали с использованием парного t-критерия Стьюдента со значением хвосты=2.

Пример 14 - Эффективность PRD-1474 на рост мышц in vivo

Мышей-самцов B6.SCID (n=10/группа) поддерживали и лечили, как описано в примере 10, за исключением того, что PRD-1474 вводили в различных дозах, как показано на фиг. 16, и продолжительность лечения составляла 28 дней. PRD-1474 в дозе 1 мг/кг показал значительное увеличение 11,1% в объеме мышц голени, по сравнению с контрольной группой PBS ($p < 0,0001$). Значительное увеличение объема мышц голени 27,7%, 29,7% и 32,8% наблюдалось также с PRD-1474 в дозе 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно. Никаких изменений в объеме сердца не наблюдалось во всех подвергнутых лечению группах, по сравнению с контрольными. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Группы с различными дозировками сравнивали с использованием дисперсионного анализа. (* $p < 0,0001$; # не значимое различие между группами).

Данные показывают, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению характеризуются существенной эффективностью в более низких дозах, чем описанные ранее миостатиновые ингибиторы (например, US 7632499, *J. Clin. Oncol.* 30(Suppl):Abstr. 2516, 2012). Таким образом, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обеспечивают повышенную эффективность в более низких дозах в сочетании с уменьшенными нежелательными побочными эффектами при введении отдельно или в комбинации с другими ингибиторами миостатина или другими лекарственными средствами для лечения описанных в настоящем документе мышечной слабости и метаболических заболеваний.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина III типа ($^{10}\text{Fn3}$), причем $^{10}\text{Fn3}$ содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG, с измененной аминокислотной последовательностью относительно последовательности соответствующей петли домена $^{10}\text{Fn3}$ человека и причем полипептид связывается миостатином.

2. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид связывается с миостатином с K_D менее чем 500 нМ.
3. Полипептид согласно вариантам осуществления 1 или 2, в котором петля ВС содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 , где
 - (a) X_1 выбирают из группы, состоящей из S, T и Y;
 - (b) X_2 выбирают из группы, состоящей из H, Y, N, R, F, G, S и T;
 - (c) X_3 выбирают из группы, состоящей из A, P, Q, S, F, H, N и R;
 - (d) X_4 выбирают из группы, состоящей из G и A;
 - (e) X_5 выбирают из группы, состоящей из H, L, R, V, N, D, F, I и K;
 - (f) X_6 выбирают из группы, состоящей из A, L, G, M, F, I и V и
 - (g) X_7 выбирают из группы, состоящей из H и N.
4. Полипептид согласно варианту осуществления 3, в котором X_1 представляет собой C.
5. Полипептид согласно вариантам осуществления 3 или 4, в котором X_2 представляет собой H или Y.
6. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-5, в котором X_3 представляет собой A или P.
7. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-6, в котором X_4 представляет собой G.
8. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-7, в котором X_5 представляет собой H, L или R.
9. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-8, в котором X_6 представляет собой A или L.
10. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-9, в котором X_7 представляет собой H.
11. Полипептид согласно варианту осуществления 3, в котором петля ВС содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38.
12. Полипептид согласно варианту осуществления 11, в котором петля ВС содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34.
13. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_8 , где X_8 представляет собой V или L.

14. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42.

15. Полипептид согласно варианту осуществления 14, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.

16. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$, где

- (a) X_9 выбирают из группы, состоящей из L, V и I;
- (b) X_{10} выбирают из группы, состоящей из T и S;
- (c) X_{11} выбирают из группы, состоящей из K, R, A, G, S, D, H, N, T и P;
- (d) X_{12} выбирают из группы, состоящей из S, T, A, E, H, K и N;
- (e) X_{13} выбирают из группы, состоящей из K, G, Q, D, E, N, T и S;
- (f) X_{14} выбирают из группы, состоящей из V, I, F, L, M, P, T и Y;
- (g) X_{15} выбирают из группы, состоящей из I, L и Y;
- (h) X_{16} выбирают из группы, состоящей из H, I, V, K, L, R, F, G, S и T;
- (i) X_{17} выбирают из группы, состоящей из Y и H и
- (j) X_{18} выбирают из группы, состоящей из K, M, L, R и V.

17. Полипептид согласно варианту осуществления 16, в котором X_9 представляет собой L или V.

18. Полипептид согласно вариантам осуществления 16 или 17, в котором X_{10} представляет собой T.

19. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-18, в котором X_{11} представляет собой K или R.

20. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-19, в котором X_{12} представляет собой S или T.

21. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-20, в котором X_{13} представляет собой K, G или Q.

22. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-21, в котором X_{14} представляет собой V или I.

23. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-22, в котором X_{15} представляет собой I.

24. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-23, в котором X_{16} представляет собой H, I или V.

25. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-24, в котором X_{17} представляет собой Y.
26. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-25, в котором X_{18} представляет собой K или M.
27. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79.
28. Полипептид согласно варианту осуществления 27, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75.
29. Полипептид согласно вариантам осуществления 1 или 2, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -A, где
- (a) X_{19} выбирают из группы, состоящей из D, E, V и W;
 - (b) X_{20} выбирают из группы, состоящей из A, S и V;
 - (c) X_{21} выбирают из группы, состоящей из R, A, G, K и L и
 - (d) X_{22} выбирают из группы, состоящей из L и R.
30. Полипептид согласно варианту осуществления 29, в котором X_{19} представляет собой D.
31. Полипептид согласно вариантам осуществления 29 или 30, в котором X_{20} представляет собой A.
32. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-31, в котором X_{21} представляет собой R или A.
33. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-32, в котором X_{22} представляет собой L.
34. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-33, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35.
35. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1, 2 и 27-34, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X_{23} -G-R-G- X_{24} , где
- (a) X_{23} выбирают из группы, состоящей из V, P, F, I и L и
 - (b) X_{24} выбирают из группы, состоящей из S, N и T.

36. Полипептид согласно варианту осуществления 35, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45.

37. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1, 2 и 29-36, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}$, где

- (a) X_{25} выбирают из группы, состоящей из I и V;
- (b) X_{26} выбирают из группы, состоящей из F, D и Y;
- (c) X_{27} выбирают из группы, состоящей из D и T;
- (d) X_{28} выбирают из группы, состоящей из P, M, V и T;
- (e) X_{29} выбирают из группы, состоящей из V, L, N, R и S;
- (f) X_{30} выбирают из группы, состоящей из H, T, L, N, Q и S;
- (g) X_{31} выбирают из группы, состоящей из F, W, Y, H и L и
- (h) X_{32} выбирают из группы, состоящей из D, A и G.

38. Полипептид согласно варианту осуществления 37, в котором X_{25} представляет собой I.

39. Полипептид согласно вариантам осуществления 37 или 38, в котором X_{26} представляет собой F.

40. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-39, в котором X_{27} представляет собой D.

41. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-40, в котором X_{28} представляет собой P.

42. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-41, в котором X_{29} представляет собой V.

43. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-42, в котором X_{30} представляет собой H или T.

44. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-43, в котором X_{31} представляет собой F или W.

45. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-44, в котором X_{32} представляет собой D.

46. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-45, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.

47. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем полипептид содержит петлю BC и петлю DE.
48. Полипептид согласно варианту осуществления 47, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, и петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45.
49. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-46, причем полипептид содержит петлю BC и петлю FG.
50. Полипептид согласно варианту осуществления 49, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.
51. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-46, причем полипептид содержит петлю DE и петлю FG.
52. Полипептид согласно варианту осуществления 51, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45, а петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.
53. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид содержит петлю BC, петлю DE и петлю FG.
54. Полипептид согласно варианту осуществления 53, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.
55. Полипептид согласно варианту осуществления 54, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, петля DE содержит SEQ ID NO: 39, и петля FG включает последовательность SEQ ID NO: 75.
56. Полипептид согласно варианту осуществления 55, в котором последовательности петли BC содержат 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен; петля DE содержит 1 аминокислотную замену и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен.
57. Полипептид согласно варианту осуществления 56, в котором

(a) петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{33}\text{-L-P-}X_{34}\text{-}X_{35}\text{-}X_{36}\text{-}X_{37}\text{-}X_{38}\text{-}X_{39}$, где

- (i) X_{33} выбирают из группы, состоящей из T и Y;
- (ii) X_{34} выбирают из группы, состоящей из Y, N, R, F, G, S и T;
- (iii) X_{35} выбирают из группы, состоящей из A, P, S, F, H, N и R;
- (iv) X_{36} представляет собой A;
- (v) X_{37} выбирают из группы, состоящей из H, L, R, V, N, D, F и I;
- (vi) X_{38} выбирают из группы, состоящей из L, G, M, F, I и V и
- (vii) X_{39} представляет собой H;

(b) петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G\text{-R-G-}X_{40}$, где X_{40} представляет собой L; и

(c) петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{41}\text{-}X_{42}\text{-}X_{43}\text{-}X_{44}\text{-}X_{45}\text{-}X_{46}\text{-}X_{47}\text{-}X_{48}\text{-}X_{49}\text{-}X_{50}$, где

- (i) X_{41} выбирают из группы, состоящей из L и I;
- (ii) X_{42} представляет собой S;
- (iii) X_{43} выбирают из группы, состоящей из K, R, A, G, S, H, N, T и P;
- (iv) X_{44} выбирают из группы, состоящей из S, A, E, H, K и N;
- (v) X_{45} выбирают из группы, состоящей из K, Q, D, E, N, T и S;
- (vi) X_{46} выбирают из группы, состоящей из V, I, F, L, M, P и T;
- (vii) X_{47} выбирают из группы, состоящей из I и Y;
- (viii) X_{48} выбирают из группы, состоящей из H, I, V, L, R, F, G, S и T;
- (ix) X_{49} представляет собой H и
- (x) X_{50} выбирают из группы, состоящей из M, L, R и V.

58. Полипептид согласно вариантам осуществления 1 или 2, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}\text{-}X_{52}\text{-}X_{53}\text{-}X_{54}\text{-}X_{55}\text{-}X_{56}\text{-}X_{57}\text{-}X_{58}\text{-}X_{59}$, где

- (a) X_{51} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (b) X_{52} выбирают из группы, состоящей из L, M и V;
- (c) X_{53} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;
- (d) X_{54} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(e) X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(f) X_{56} выбирают из группы, состоящей из G и S;

(g) X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(h) X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и

(i) X_{59} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y.

59. Полипептид согласно варианту осуществления 58, в котором:

(a) X_{51} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;

(b) X_{52} выбирают из группы, состоящей из L;

(c) X_{53} выбирают из группы, состоящей из P;

(d) X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(e) X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(f) X_{56} выбирают из группы, состоящей из G;

(g) X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y;

(h) X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и

(i) X_{59} выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y.

60. Полипептид согласно варианту осуществления 59, в котором:

(a) X_{51} выбирают из группы, состоящей из F, S и W;

(b) X_{52} выбирают из группы, состоящей из L;

(c) X_{53} выбирают из группы, состоящей из P;

(d) X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;

(e) X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y;

(f) X_{56} выбирают из группы, состоящей из G;

(g) X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;

(h) X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G и L; и

(i) X_{59} выбирают из группы, состоящей из H, N и Q.

61. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-60, в котором X_{51} представляет собой S.

62. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором X_{52} представляет собой L.

63. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором X_{53} представляет собой P
64. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58, 59 и 61-63, в котором X_{54} представляет собой H.
65. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-64, в котором X_{55} представляет собой Q.
66. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором X_{56} представляет собой G.
67. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-66, в котором X_{57} представляет собой K.
68. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-67, в котором X_{58} представляет собой A.
69. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-68, в котором X_{59} представляет собой N.
70. Полипептид согласно варианту осуществления 58, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38.
71. Полипептид согласно варианту осуществления 70, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34.
72. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-71, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- X_{60} , где X_{60} представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V.
73. Полипептид согласно варианту осуществления 72, в котором X_{60} представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V.
74. Полипептид согласно варианту осуществления 73, в котором X_{60} представляет собой C, E, I, L, M и V.
75. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 72-74, в котором X_{60} представляет собой V.
76. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-75, в котором петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42.
77. Полипептид согласно варианту осуществления 76, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.

78. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-77, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где

- (a) X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y;
- (b) X_{62} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (c) X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (d) X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (e) X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (f) X_{66} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;
- (g) X_{67} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (h) X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (i) X_{69} выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и
- (j) X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

79. Полипептид согласно варианту осуществления 78, в котором:

- (a) X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V;
- (b) X_{62} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (c) X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y;
- (d) X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (e) X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
- (f) X_{66} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y;
- (g) X_{67} выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y;
- (h) X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (i) X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и

(j) X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T и V.

80. Полипептид согласно варианту осуществления 79, в котором:

- (a) X_{61} выбирают из группы, состоящей из I и V;
- (b) X_{62} выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, T, V, W и Y;
- (c) X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V;
- (d) X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
- (e) X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W;
- (f) X_{66} выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y;
- (g) X_{67} выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y;
- (h) X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W;
- (i) X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и
- (j) X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

81. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-80, в котором X_{61} представляет собой V.

82. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-81, в котором X_{62} представляет собой T.

83. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-82, в котором X_{63} представляет собой D.

84. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-83, в котором X_{64} представляет собой T.

85. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-84, в котором X_{65} представляет собой G.

86. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-85, в котором X_{66} представляет собой Y.

87. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-86, в котором X_{67} представляет собой L.

88. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-87, в котором X_{68} представляет собой K.

89. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-88, в котором X_{69} представляет собой Y.

90. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-89, в котором X_{70} представляет собой K.

91. Полипептид согласно варианту осуществления 1 или 2, в котором

(a) петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$, где

(i) X_{51} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(ii) X_{52} выбирают из группы, состоящей из L, M и V;

(iii) X_{53} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;

(iv) X_{54} представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(v) X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(vi) X_{56} выбирают из группы, состоящей из G и S;

(vii) X_{57} представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(viii) X_{58} представляет собой A, C, G, L, M, S и T; и

(ix) X_{59} представляет собой A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y;

(b) петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $G-R-G-X_{60}$, где X_{60} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V; и

(c) петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$, где

(i) X_{61} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y;

(ii) X_{62} представляет собой A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(iii) X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(iv) X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(v) X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(vi) X_{66} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;

(vii) X_{67} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(viii) X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(ix) X_{69} выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и

(x) X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

92. Полипептид согласно варианту осуществления 91, в котором:

(a) (i) X₅₁ выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;

(ii) X₅₂ представляет собой L;

(iii) X₅₃ представляет собой P;

(iv) X₅₄ выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(v) X₅₅ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(vi) X₅₆ представляет собой G;

(vii) X₅₇ выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y;

(viii) X₅₈ выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и

(ix) X₅₉ выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y;

(b) X₆₀ выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M, Q, T и V; и

(c) (i) X₆₁ выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V;

(ii) X₆₂ представляет собой C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y;

(iii) X₆₃ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y;

(iv) X₆₄ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;

(v) X₆₅ выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;

(vi) X₆₆ выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y;

(vii) X₆₇ выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y;

(viii) X₆₈ выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;

(ix) X₆₉ выбирают из группы, состоящей из W и Y; и

(x) X₇₀ выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.

93. Полипептид согласно варианту осуществления 92, в котором:

(a) (i) X₅₁ выбирают из группы, состоящей из F, S и W;

(ii) X₅₂ представляет собой L;

- (iii) X_{53} представляет собой P;
- (iv) X_{54} выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;
- (v) X_{55} выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, и Y;
- (vi) X_{56} представляет собой G;
- (vii) X_{57} выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;
- (viii) X_{58} выбирают из группы, состоящей из A, G и L;
- (ix) X_{59} выбирают из группы, состоящей из H, N и Q;
- (b) X_{60} выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M и V; и
- (c) (i) X_{61} выбирают из группы, состоящей из I и V;
- (ii) X_{62} представляет собой C, F, I, L, M, T, V, W и Y;
- (iii) X_{63} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V;
- (iv) X_{64} выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
- (v) X_{65} выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W;
- (vi) X_{66} выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y;
- (vii) X_{67} выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y;
- (viii) X_{68} выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W;
- (ix) X_{69} выбирают из группы, состоящей из W и Y; и
- (x) X_{70} выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

94. Полипептид согласно варианту осуществления 92, в котором:

- (a) (i) X_{51} представляет собой S;
- (ii) X_{52} представляет собой L;
- (iii) X_{53} представляет собой P;
- (iv) X_{54} представляет собой H;
- (v) X_{55} представляет собой Q;
- (vi) X_{56} представляет собой G; и
- (vii) X_{57} представляет собой K;
- (viii) X_{58} представляет собой A; и
- (ix) X_{59} представляет собой N;
- (b) X_{60} представляет собой V; и
- (c) (i) X_{61} представляет собой V;
- (ii) X_{62} представляет собой T;
- (iii) X_{63} представляет собой D;
- (iv) X_{64} представляет собой T;

- (v) X₆₅ представляет собой G;
- (vi) X₆₆ представляет собой Y;
- (vii) X₆₇ представляет собой L;
- (viii) X₆₈ представляет собой K;
- (ix) X₆₉ представляет собой Y; и
- (x) X₇₀ представляет собой K.

95. Полипептид согласно варианту осуществления 1 или 2, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную областям петель не-BC, DE и FG SEQ ID NO: 118, 273, 281 или 331.

96. Полипептид согласно варианту осуществления 1 или 2, в котором аминокислотная последовательность петель BC, DE или FG по меньшей мере на 80% идентична любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно.

97. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 80-123, 228-239, 252-273, 281 и 331.

98. Полипептид согласно варианту осуществления 97, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 331.

99. Полипептид согласно варианту осуществления 97, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 273.

100. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80-123, 228-239, 252-273, 281 и 331.

101. Полипептид согласно варианту осуществления 100, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 331.

102. Полипептид согласно варианту осуществления 101, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 273.

103. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором сайт связывания аднектина на миостатине представляет собой прерывистый.

104. Полипептид согласно варианту осуществления 103, причем полипептид связывается с областью в пределах аминокислот 56-66.

105. Полипептид согласно варианту осуществления 103, причем полипептид связывается с областью в пределах аминокислот 85-101.
106. Полипептид согласно варианту осуществления 103, причем полипептид связывается с областью в пределах аминокислот 85-101 и 56-66 в SEQ ID NO: 3.
107. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид не конкурирует за связывание с миостатином с ActRIIB.
108. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид конкурирует за связывание с миостатином с ALK4 и/или ALK5.
109. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, Fc-фрагмента, трансферрина, сывороточного альбумина, связывающего сывороточный альбумин белка и связывающего сывороточный иммуноглобулин белка.
110. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент и полипептид связаны с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи, пептидной связи, полипептида, полимерного сахара или полиэтиленгликолевого фрагмента.
111. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент и полипептид связаны через линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 181-227.
112. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором связывающий сывороточный альбумин белок содержит десятый домен фибронектина типа III (¹⁰Fn3).
113. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором домен ¹⁰Fn3 связывается с HSA.
114. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент представляет собой Fc.
115. Полипептид согласно варианту осуществления 114, в котором Fc находится на N-конце полипептида.
116. Полипептид согласно варианту осуществления 115, в котором Fc находится на C-конце полипептида.
117. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 114-116, причем полипептид образует димер.

118. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором РК фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль.
119. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.
120. Композиция согласно варианту осуществления 118, причем композиция представляет собой по существу без эндотоксина.
121. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-116.
122. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 121, причем молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124-167, 240-251 и 284-305.
123. Вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-116.
124. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-115.
125. Способ производства связывающего миостатин полипептида, включающий культивирование клетки согласно варианту осуществления 124 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида и очистки полипептида.
126. Способ ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому одному из вариантов осуществления 1-120.
127. Способ согласно варианту осуществления 126, при котором заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из: мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза, застойного обструктивного заболевания легких, хронической сердечной недостаточности, злокачественной опухоли, СПИД, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, уремии, ревматоидного артрита, саркопении, мышечной слабости из-за длительного постельного режима, травмы спинного мозга, инсульта, перелома костей, старения, диабета, ожирения, гипергликемии, кахексии, остеоартрита, остеопороза, инфаркта миокарда и фиброза.
128. Способ ослабления или ингибирования нарушения, связанного с дегенерацией или атрофией мышц у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-120.

129. Способ согласно варианту осуществления 128, при котором заболевание выбрано из группы, состоящей из мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза, застойного обструктивного заболевания легких, хронической сердечной недостаточности, злокачественной опухоли, СПИД, кахексии, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, уремии, ревматоидного артрита, саркопении, мышечной слабости из-за длительного постельного режима, травмы спинного мозга, инсульта, перелома костей и старения.

130. Способ согласно варианту осуществления 129, при котором заболевание представляет собой мышечную дистрофию.

131. Способ согласно варианту осуществления 128, при котором введение полипептида субъекту приводит по меньшей мере к одному из следующих биологических эффектов:

- (a) увеличению мышечной массы;
- (b) увеличению числа мышечных клеток;
- (c) увеличению размера мышечных клеток и
- (d) повышению мышечной силы.

132. Способ ослабления или ингибирования нарушения обмена веществ у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-120.

133. Способ согласно варианту осуществления 132, при котором субъект характеризуется наличием заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, гипергликемии, гиперинсулинемии, гиперлипидемии, резистентности к инсулину, нарушения метаболизма глюкозы, ожирения и метаболического синдрома.

134. Способ согласно варианту осуществления 132, при котором заболевание или нарушение представляет собой сахарный диабет типа II.

135. Способ согласно варианту осуществления 134, дополнительно включающий введение второй терапевтической композиции для лечения сахарного диабета.

136. Способ согласно любому из вариантов осуществления 131-135, при котором введение полипептида субъекту приводит по меньшей мере к одному из следующих биологических эффектов:

- (a) повышению чувствительности к инсулину;
- (b) увеличению потребления глюкозы клетками у субъекта;
- (c) снижению содержания глюкозы в крови и

(d) снижению жира в организме.

137. Способ увеличения сухой мышечной массы у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-120.

138. Способ увеличения соотношения сухой мышечной массы к жиру у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-120.

139. Набор, содержащий полипептид или композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-120 и инструкции по применению.

140. Способ обнаружения или измерения миостатина в образце, включающий контактирование образца с полипептидом согласно любому из вариантов осуществления 1-117 и обнаружение или измерение связывания полипептида с миостатином.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина типа III (¹⁰Fn3), который связывается с миостатином и содержит петли AB, BC, CD, DE, EF и FG, где петли BC, DE и FG содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 39 и 75 соответственно.
2. Полипептид по п. 1, в котором домен ¹⁰Fn3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331.
3. Полипептид по п.п. 1 или 2, в котором домен ¹⁰Fn3 дополнительно содержит N-концевую последовательность удлинения содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307.
4. Полипептид по п.п. 1 или 2, в котором домен ¹⁰Fn3 дополнительно содержит C-концевую последовательность удлинения содержащую аминокислотную последовательность EI.
5. Полипептид по п.п. 1 или 2, в котором домен ¹⁰Fn3 дополнительно содержит N-концевую последовательность удлинения содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307 и C-концевую последовательность удлинения содержащую аминокислотную последовательность EI.
6. Полипептид по п. 5, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281.
7. Полипептид по п.п. 1 или 2, дополнительно содержащий один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, Fc-фрагмента, трансферрина, сывороточного альбумина, связывающего сывороточный альбумин белка и связывающего сывороточный иммуноглобулин белка.
8. Полипептид по п. 7, где ПК фрагмент и полипептид связаны через линкер с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 187.
9. Полипептид по п. 7, в котором ПК фрагмент представляет собой Fc.

10. Полипептид по п. 9, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:269.

11. Полипептид по п. 9, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273.

12. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273.

13. Композиция, содержащая полипептид по пункту 1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Композиция, содержащая полипептид по пункту 11 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Композиция, содержащая полипептид по пункту 12 и фармацевтически приемлемый носитель.

1979_B06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGHVNYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSQMIHYMPISINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 80)

2062_G02 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWVSPRGRAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIYRDGMSHHDPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 81)

2522_C09 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWEVPRGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV LGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTVYRDGPLLAPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 82)

2523_G06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWAPLGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIIFRTGMVQYDPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 83)

2524_C11 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGLAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTNSEIILYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 84)

2524_D09 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWYLPYPAHMNYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGLTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSQILHHRPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 85)

2524_E10 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPFAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 86)

2524_H05 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAGLANYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTHSNIIIRYVPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 87)

2524_H11 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVSSTKVIIVLPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 88)

2525_B01 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPNFGLINYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTIITKSTIIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 89)

2525_D02 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTSVILYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 90)

2525_D05 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTSKQLIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 91)

2525_F07 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAAHMNYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSQVIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 92)

2987_A06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 93)

2987_B04 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 94)

2987_B09 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTSKQIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 95)

2987_C02 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 96)

2987_D05 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 97)

2987_E03 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 98)

2987_E08 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTSKQIIHYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 99)

2987_F01 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRSKIIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 100)

2987_F06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 101)

2987_G04 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 102)

2987_G09 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVSSTKVIIVLPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 103)

2987_H02 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTKSKVIHYMPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 104)

2987_H07 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 105)

3006_A10 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPGGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV IGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVTIDRDGVNHFAPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 106)

3007_B08 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPTPGLAHYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTHHGVIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 107)

3007_C09 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHRGVANYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTGANVIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 108)

3007_C10 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPSSGVVAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTNTGVIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 109)

3008_A03 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHHGFGHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTATGIIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 110)

3008_B08 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHAGDAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTRAGFYRYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 111)

3008_D04 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHNGVAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTREEVISYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 112)

3008_F01 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPRQGLANYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTAAGVIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 113)

3008_G01 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPGPGHFHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTANQPIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 114)

3008_G03 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHPGLGHYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTIITPETIIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 115)

3115_D04 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPRGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV FGRGTTATISGLKPGVDYTITVYAVTIDRDGTRSFDPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 116)

3115_E06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPAGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV VGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIIFRDGPVWDPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 117)

3116_A06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPHQGKANYYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTDTGFLYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 118)

3116_A07 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPKGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV VGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIIFRDGPVWDPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 119)

3116_C01 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPNPGIAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTGSDTIFYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 120)

3116_C06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPRPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTGKDVIFYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 121)

3116_H06 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPAGLAR-YYRITYGETGGNSPVQEFV VGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVTIIFRDGVVNYGPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 122)

3146_A08 MGVS DVPRDLEVVAATPTSLLSISWSLPNPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFV PGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTDTGFIYKPI SINYTEIDKPSQHHHHHH (SEQ ID NO: 123)



Фиг. 2



Фиг. 3



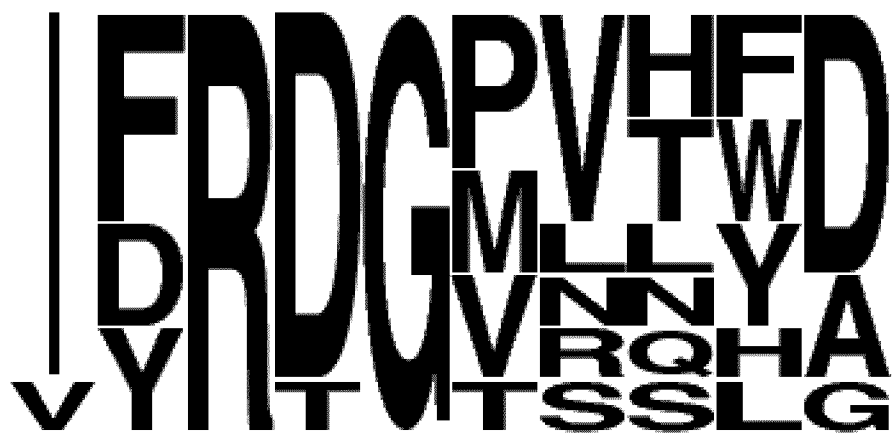
Фиг. 4



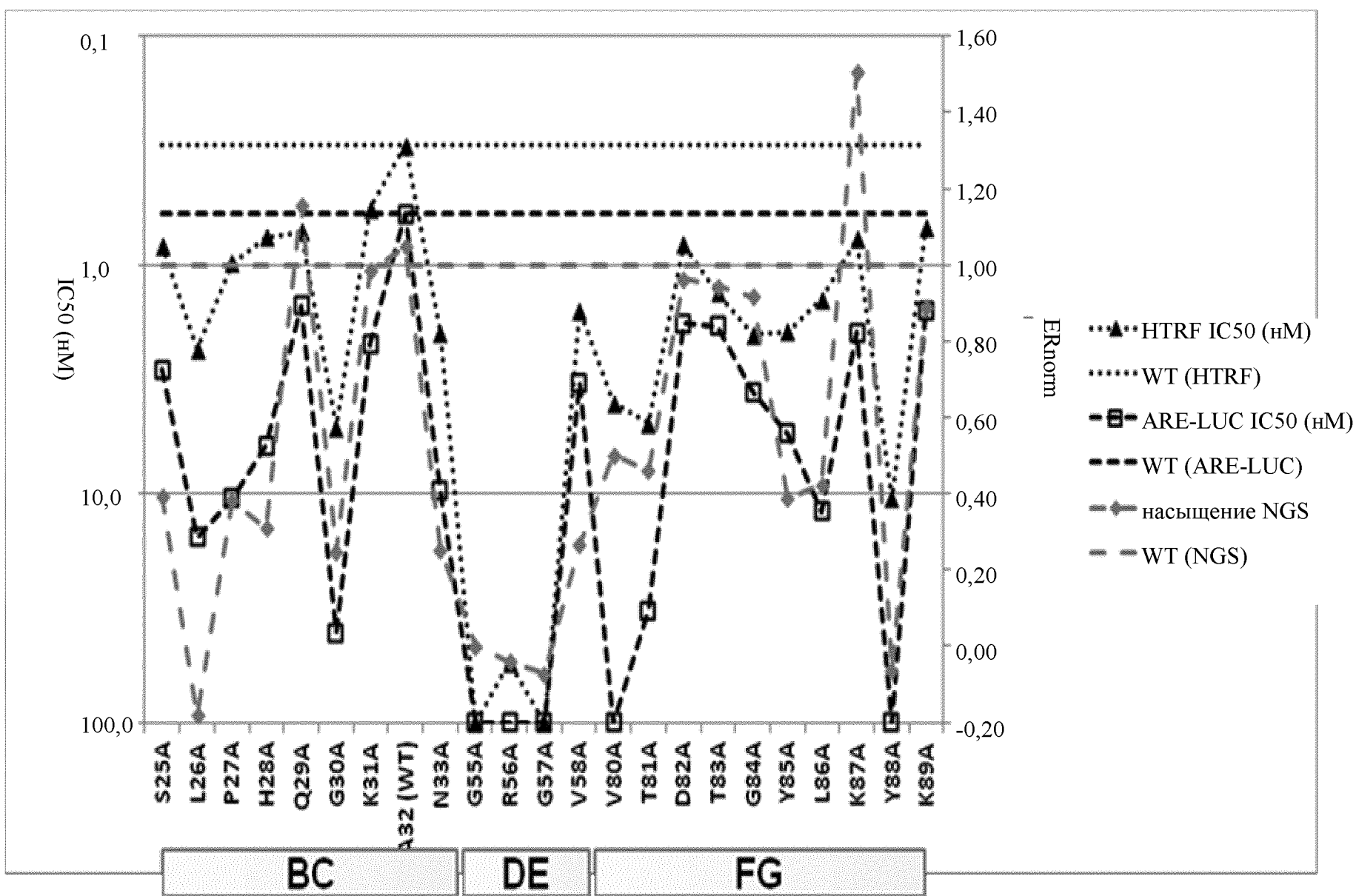
Фиг. 5

V
P
E
L
V
G
R
G
N
S
T

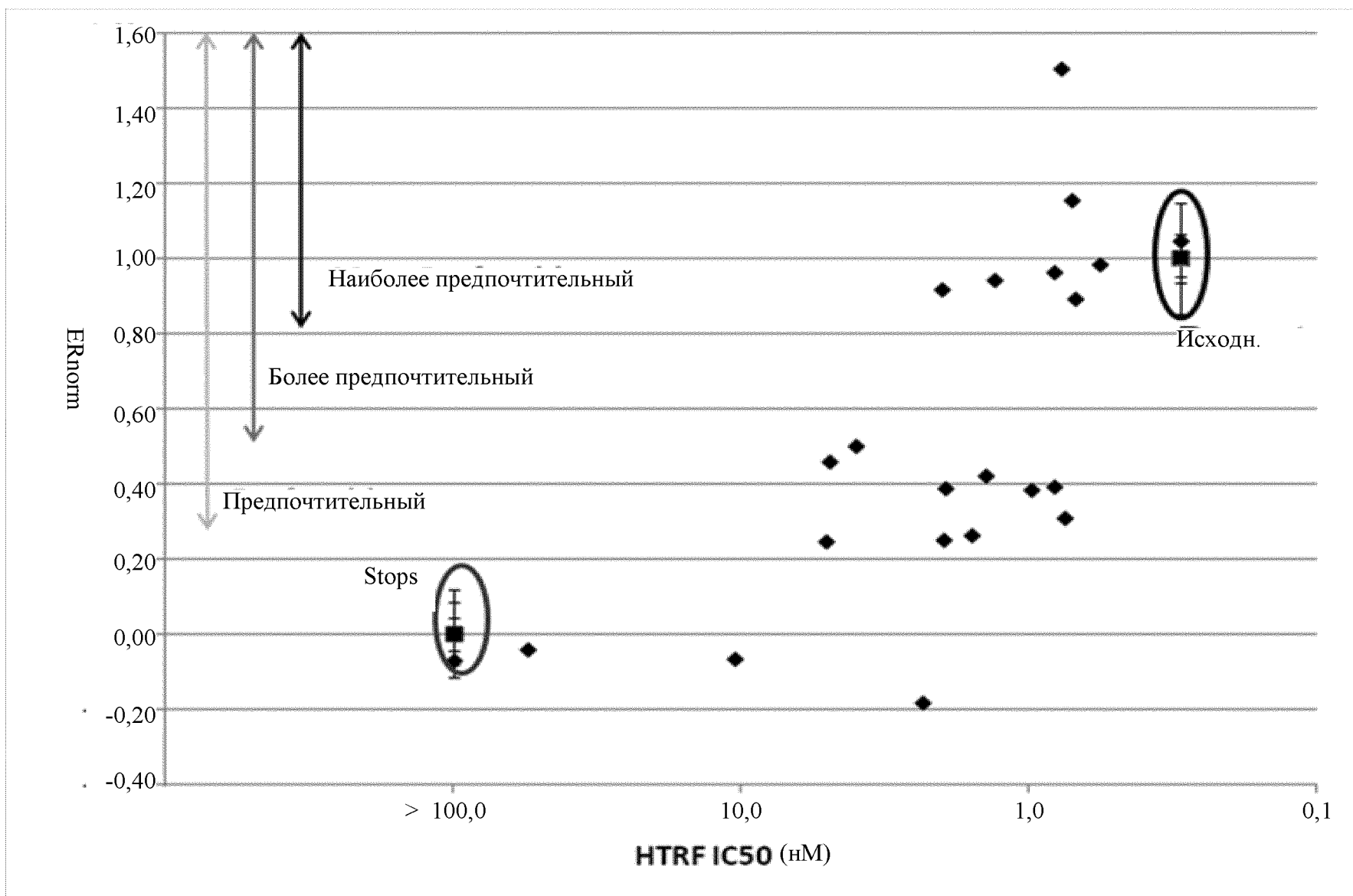
Фиг. 6



Фиг. 7

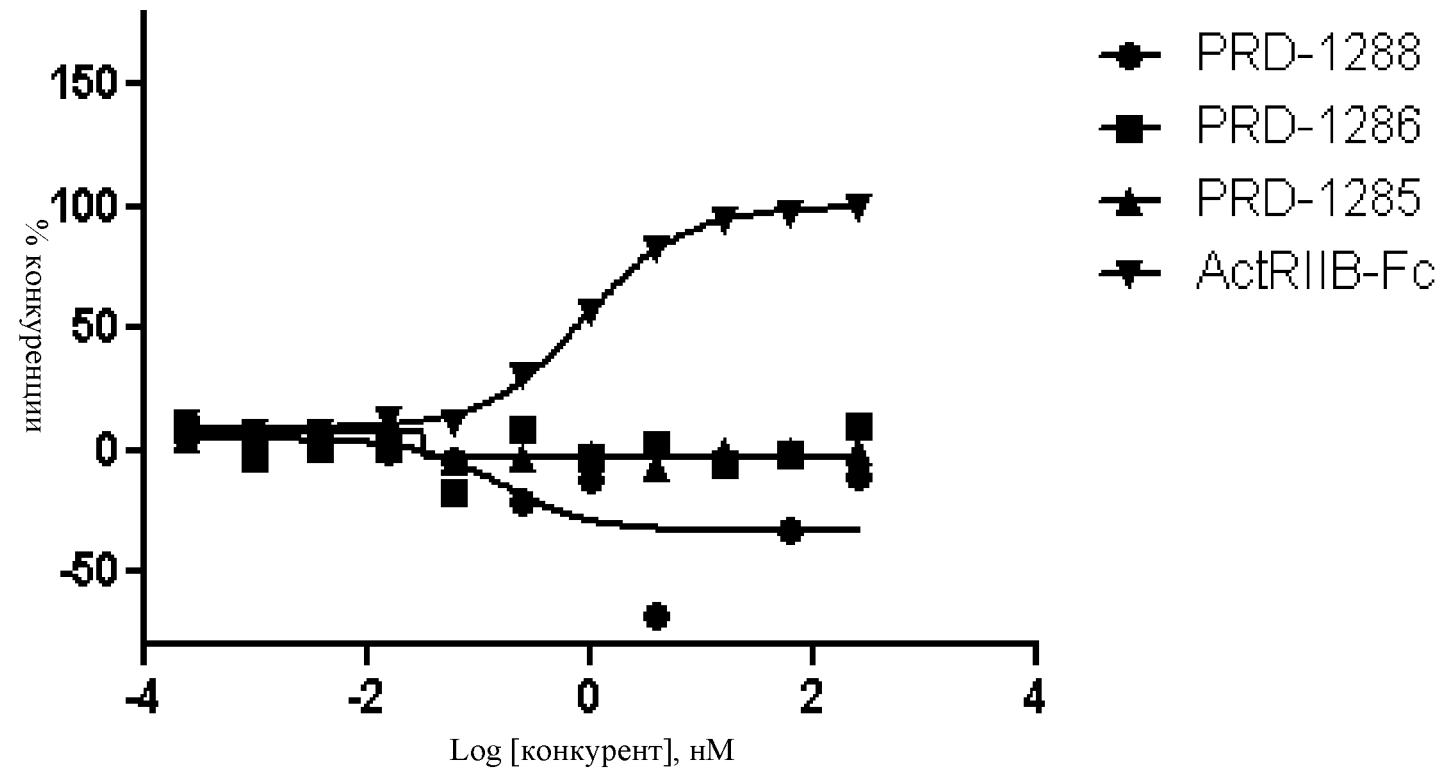


Фиг. 8

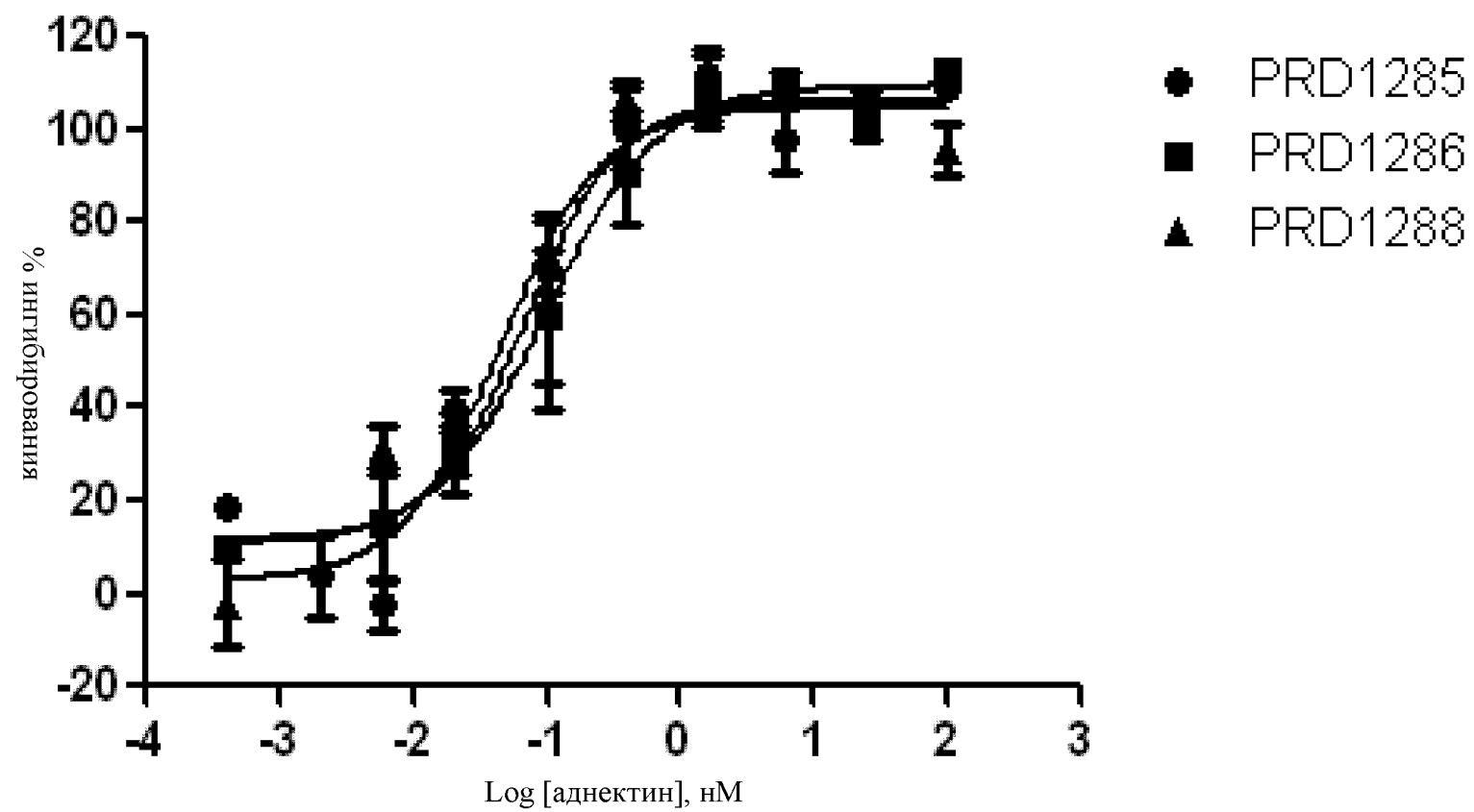


Фиг. 9

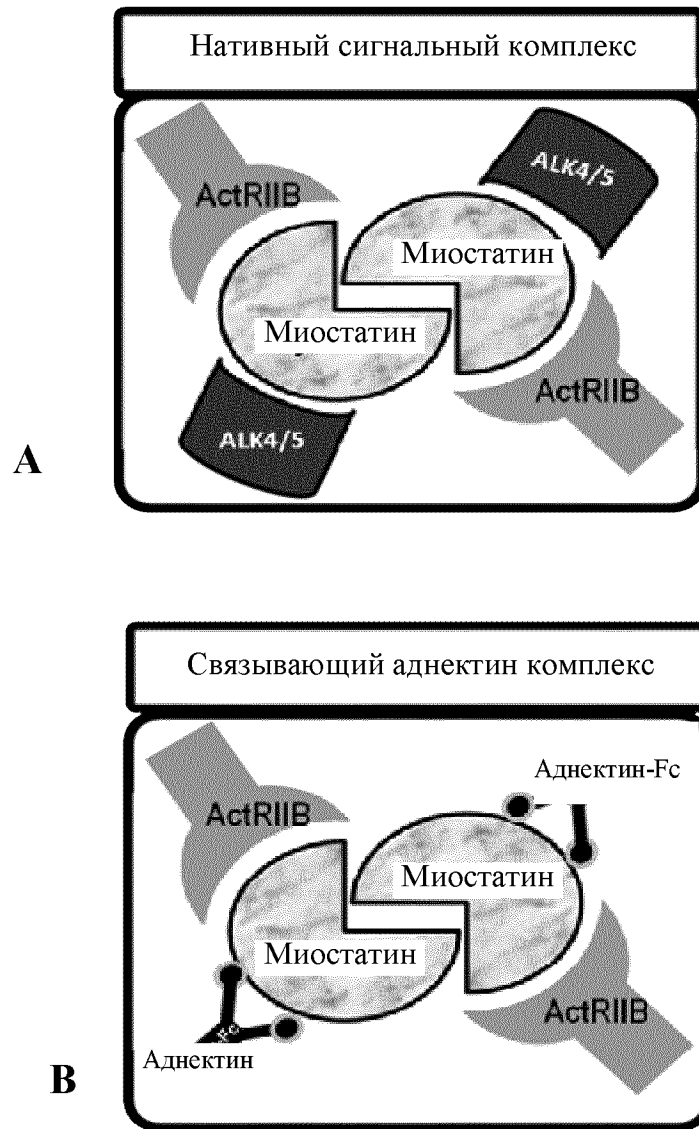
Конкурентный анализ ELISA миостатина ActRIIB



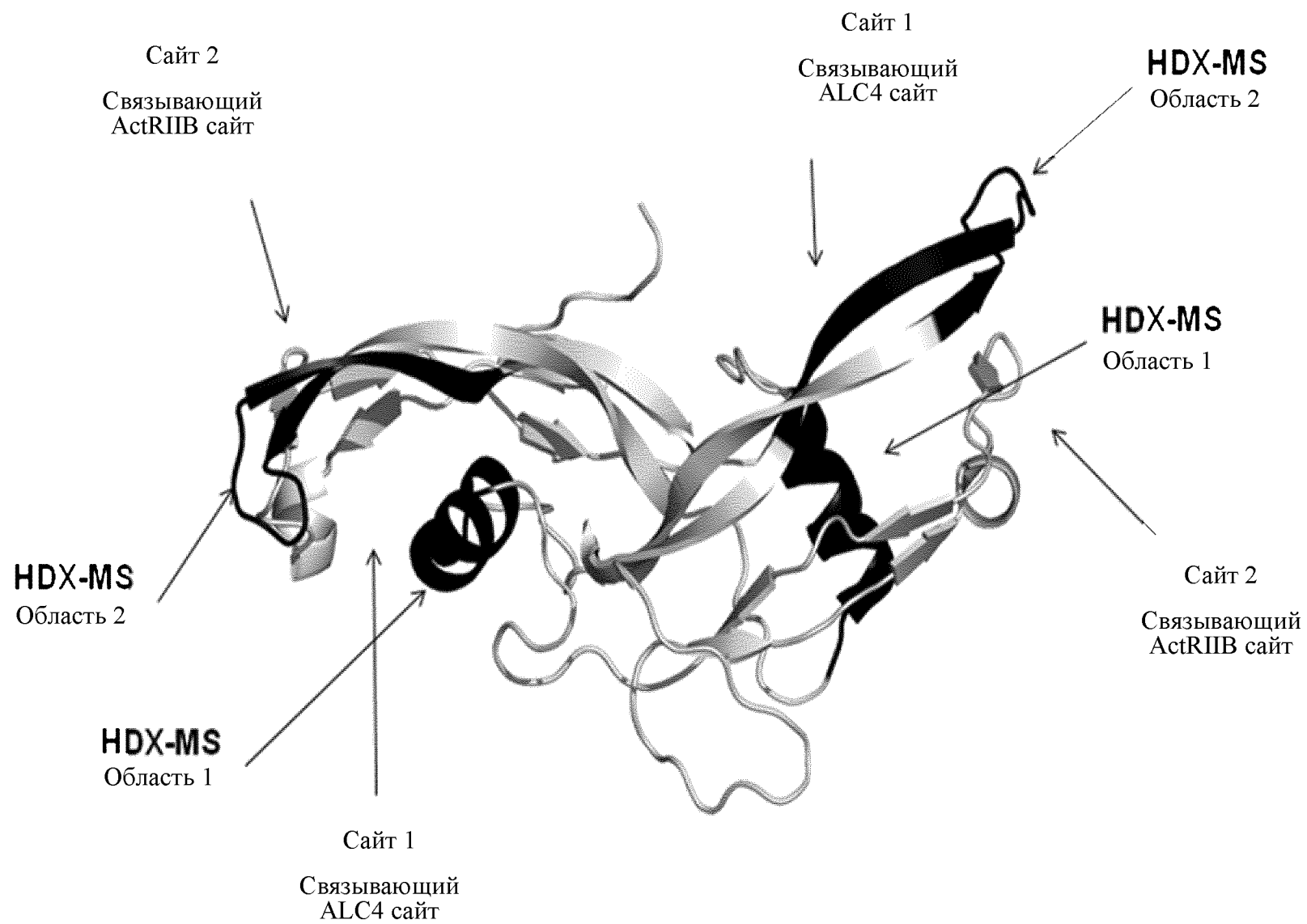
Фиг. 10



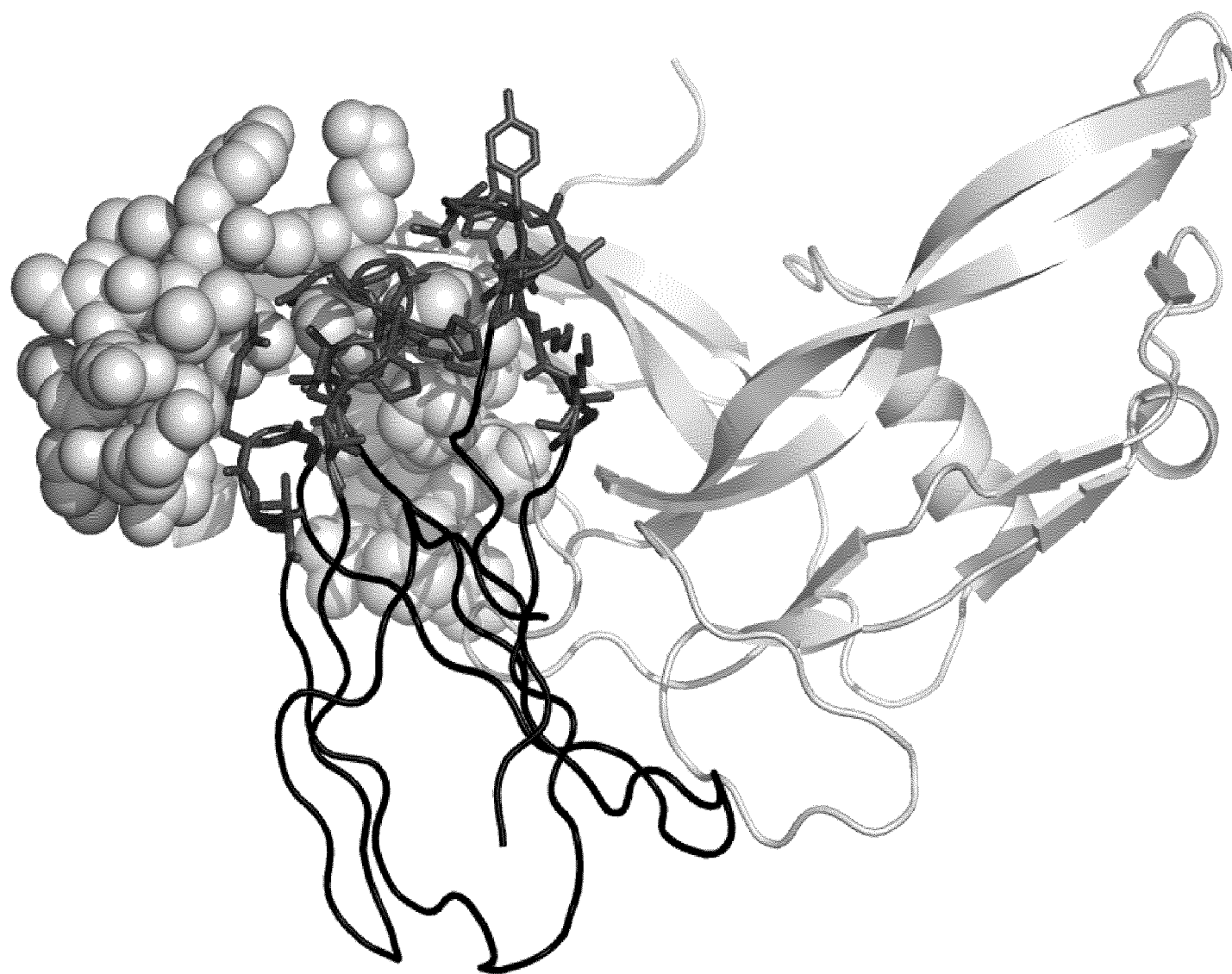
Фиг. 11



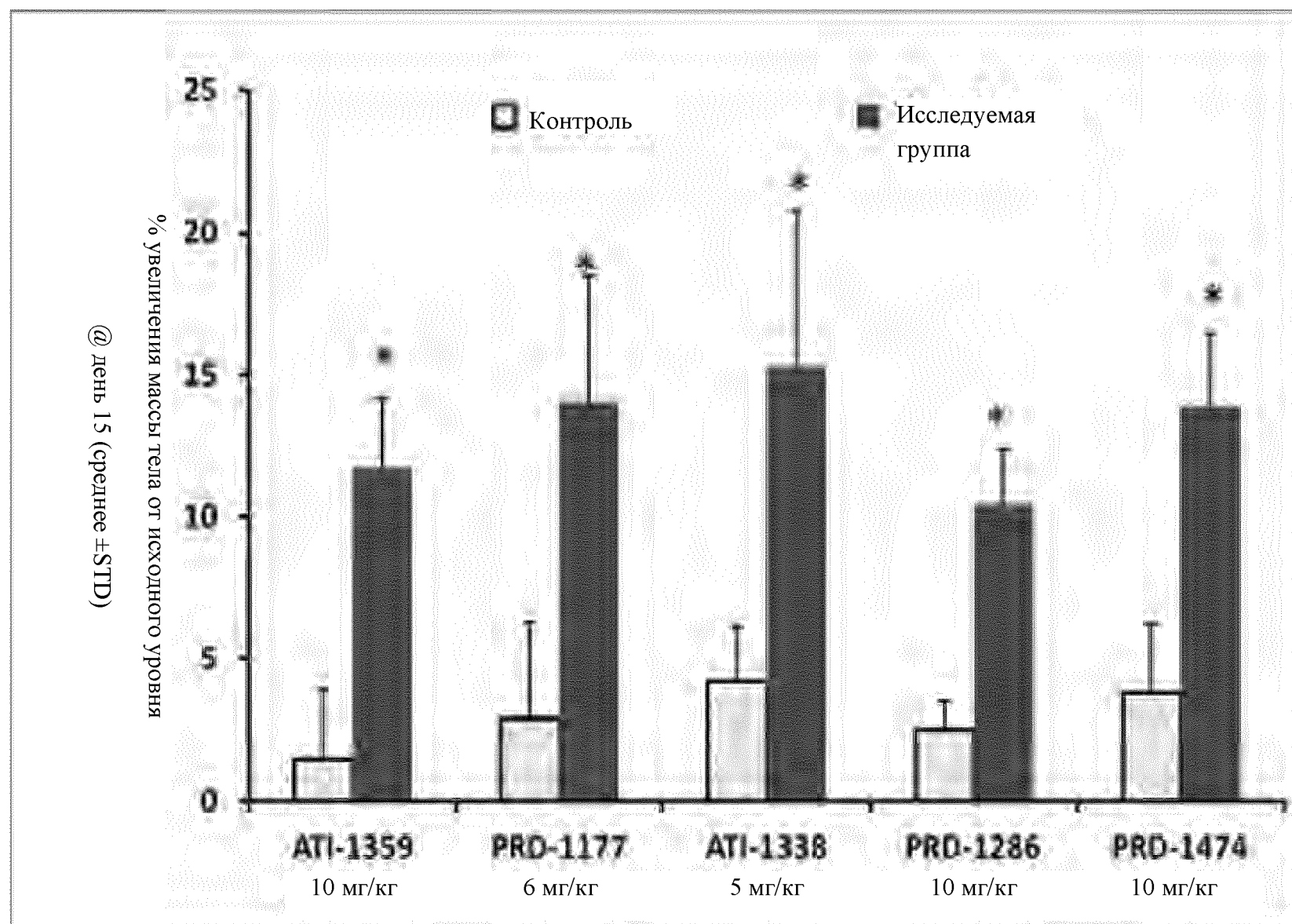
Фиг. 12



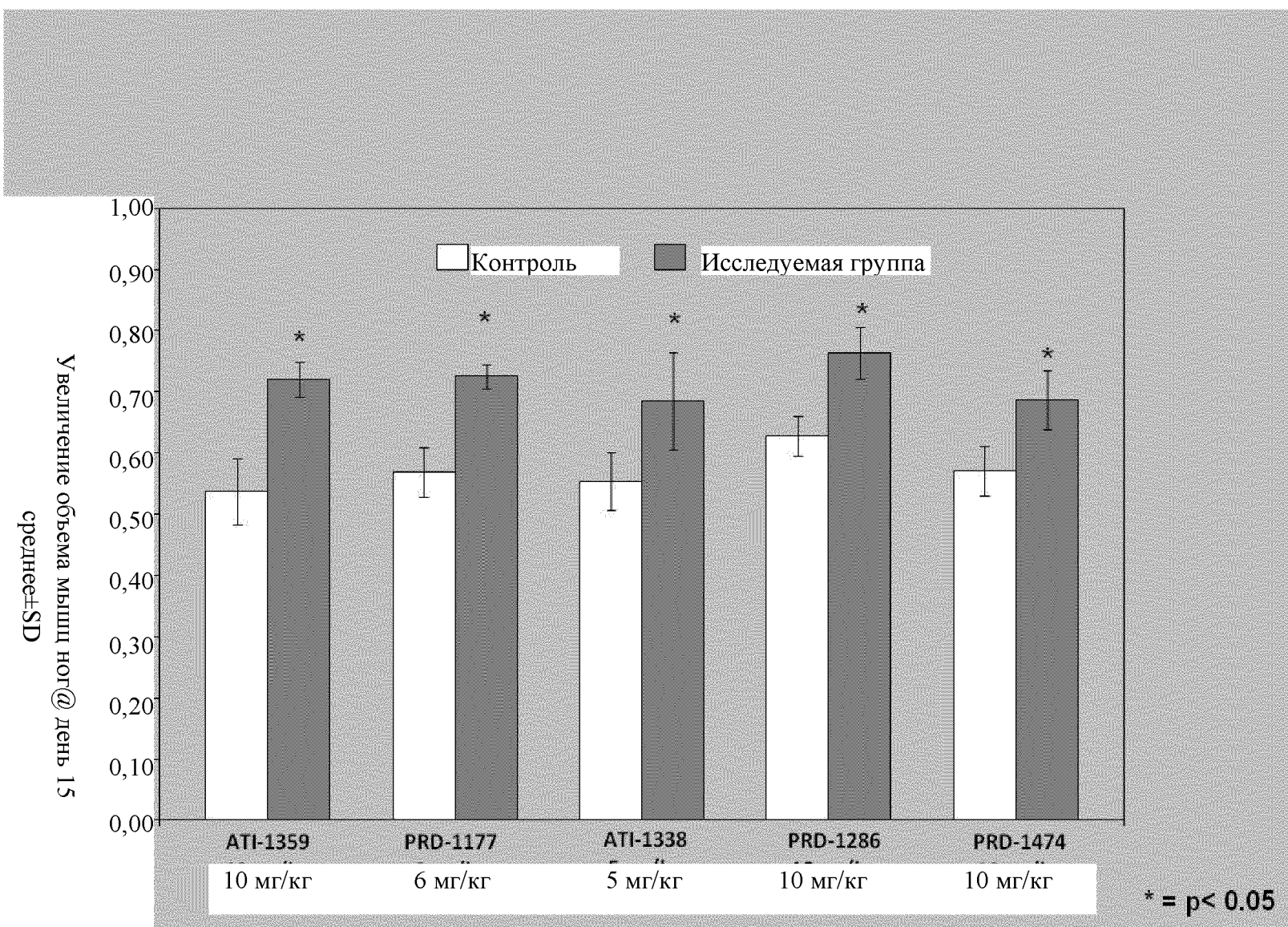
Фиг. 13А



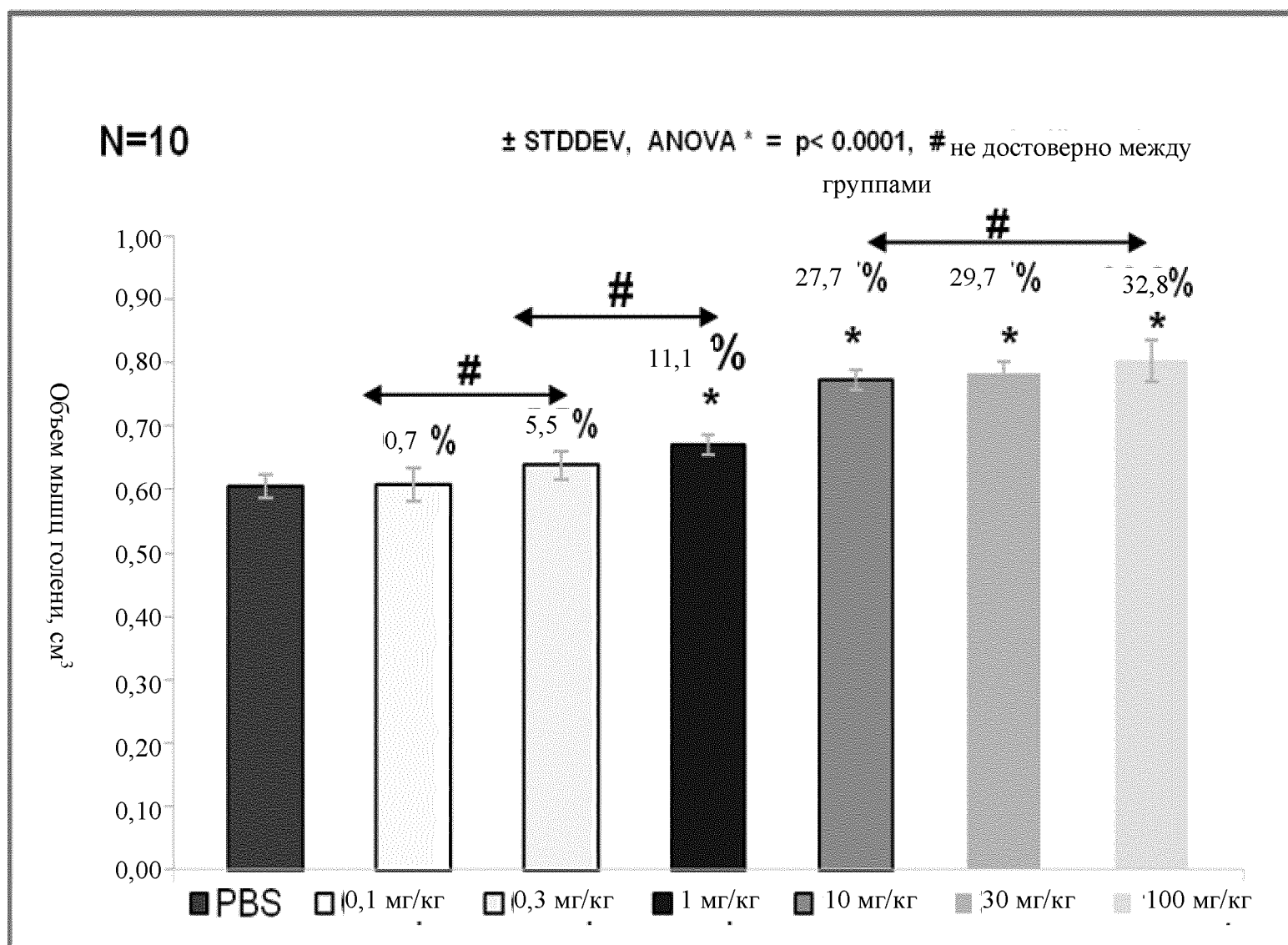
Фиг. 13В



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16