



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.19

(21) Номер заявки
201791112

(22) Дата подачи заявки
2015.11.24

(51) Int. Cl. **C07K 14/78** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С PD-L1 ПОЛИПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ¹⁰FN3 ДОМЕНА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

(31) **62/084,298**

(32) **2014.11.25**

(33) **US**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/US2015/062485**

(87) **WO 2016/086021 2016.06.02**

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

(72) Изобретатель:

**Морин Пол Е., Доннелли Дэвид,
Липовсек Даса, Гокемайер Йохем,
Джуре-Кункел Мариа Н., Фабрицио
Давид, Райт Мартин С., Дисчино
Дуглас, Бонакорси Сэмюэл Дж., Смит
Ральф Адам, Лафонт Вирджини,
Кохен Дэниэл (US)**

(74) Представитель:

**Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М.,
Карпенко О.Ю., Строкова О.В.,
Глухарёва А.О., Дементьев В.Н. (RU)**

(56) **US-A1-2013323249**
US-A1-2013309250

Benjamin J. Hackel ET AL.: "Use of 64 cu-labeled Fibronectin Domain with egFr-Overexpressing Tumor Xenograft: Molecular Imaging 1", Radiology, vol. 263, no. 1 1 April 2012 (2012-04-01), pages 179-188, XP055255254, DOI: 10.1148/radiol.12111504/-/DC1, Retrieved from the Internet: URL: <http://pubs.rsna.org/doi/pdf/10.1148/radiol.12111504> [retrieved on 2016-03-04], abstract, left column; page 180

CAM PATTERSON ET AL.: "Development of a New Positron Emission Tomography Tracer for Targeting Tumor Angiogenesis: Synthesis, Small Animal Imaging, and

Radiation Dosimetry", MOLECULES, vol. 18, no. 5, 15 May 2013 (2013-05-15), pages 5594-5610, XP055255261, DOI: 10.3390/molecules18055594, abstract, first paragraph; page 5596

KOIDE SHOHEI ET AL.: "Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain (¹⁰Fn3)", METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEM. PRESS, USA, vol. 503, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 135-156, XP009188818, ISSN: 1557-7988, DOI: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00006-9, abstract, first paragraph; page 136

BRAD D. MAXWELL ET AL.: "The synthesis of a carbon-14 labeled pegylated Adnectin(TM) for placental transfer studies in guinea pigs", JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 56, no. 9-10, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 492-494, XP055255267, CHICHESTER; GB ISSN: 0362-4803, DOI: 10.1002/jlcr.3077, the whole document

H. WANG ET AL.: "Development of a Carbon-14 Labeling Approach to Support Disposition Studies with a Pegylated Biologic", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 40, no. 9, 24 May 2012 (2012-05-24), pages 1677-1685, XP055255270, DOI: 10.1124/dmd.112.044792, the whole document

KATELYN E. MCCABE AND ANNA M. WU: "Positive progress in immunoPET--not just a coincidence", CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, LIEBERT, US, vol. 25, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 253-261, XP009150571, DOI: 10.1089/GBR.2010.0776, the whole document

SALSANO ET AL.: "PET imaging using radiolabelled antibodies: future direction in tumor diagnosis and correlate applications", RESEARCH AND REPORTS IN NUCLEAR MEDICINE, 1 July 2013 (2013-07-01), page 9, XP055255276, DOI: 10.2147/RRNM.S35186, the whole document

S. HESKAMP ET AL.: "Noninvasive Imaging of Tumor PD-L1 Expression Using Radiolabeled Anti-PD-L1 Antibodies", CANCER RESEARCH, vol. 75, no. 14, 14 May 2015 (2015-05-14), pages 2928-2936, XP055255277, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3477, abstract, page 2934

(57) Изобретение относится к новым полипептидам на основе ¹⁰Fn3 домена, которые специфично связываются с PD-L1. Раскрыты визуализирующие средства, а также способы диагностики с их использованием.

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/084298 под названием "Новые связывающиеся с PD-L1 полипептиды для визуализации", поданной 25 ноября 2014 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Лиганд-1 белка программируемой клеточной гибели (PD-L1) представляет собой поверхностный гликопротеиновый лиганд для PD-1, ключевого рецептора иммунных контрольных точек, экспрессируемый активированными Т- и В-клетками и опосредующий иммуносупрессию, который обнаруживается как на антигенпрезентирующих клетках, так и на человеческих злокачественных опухолях и ослабляет активацию Т-клеток и секрецию ими цитокинов за счет связывания с PD-1 (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Ингибирование взаимодействия PD-L1/PD-1 создает возможность для сильной противоопухолевой активности в моделях в доклинических исследованиях, и антитела, которые нарушают это взаимодействие, вступили в клинические испытания для лечения злокачественной опухоли (патенты США № 8008449 и № 7943743; Brahmer et al., 2010; Topalian et al., 2012b; Brahmer et al., 2012; Flies et al., 2011; Pardoll, 2012; Hamid and Carvajal, 2013).

РЕТ или позитронно-эмиссионная томография представляет собой неинвазивную методику медицинской радиологии, с помощью которой получают трехмерное изображение различных молекулярных процессов внутри организма или положения белков, ассоциированных с патологией заболевания. В данном методе выявляют пары гамма-лучей, опосредованно излучаемых позитронно-активным радионуклидом (маркером), введенным в организм на биологически активной молекуле. Инструменты для визуализации с помощью РЕТ имеют широкий спектр применений для разработки лекарственных средств и обладают уникальным преимуществом для трансляционной медицины, заключающемся в том, что тот же самый инструмент можно применять как в доклинических, так и в клинических условиях. Примеры включают в себя непосредственную визуализацию насыщения мишеней *in vivo*; мониторинг поглощения в нормальных тканях для прогнозирования токсичности или вариации среди пациентов; количественную оценку пораженной заболеванием ткани; метастазирования опухоли; мониторинг эффективности лекарственного средства со временем или возникновения устойчивости со временем и т.д.

В данном документе описаны новые аднектины к PD-L1, подходящие для применения в качестве диагностических/визуализирующих средств, например, для применения в позитронно-эмиссионной томографии.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение основывается на открытии новых аднектинов к человеческому PD-L1, которые применимы в качестве диагностических/визуализирующих средств, например, для применения в позитронно-эмиссионной томографии. Эти средства являются пригодными, например, для установления различий между клетками, экспрессирующими PD-L1, и клетками, не экспрессирующими PD-L1, например, опухолевыми клетками, и для установления различий между тканью, экспрессирующей PD-L1, и тканью, не экспрессирующей PD-L1, например, тканью злокачественной опухоли.

В соответствии с одним аспектом в данном документе представлен полипептид, содержащий десятый фибронектиновый домен типа III ($^{10}\text{Fn3}$), причем (а) $^{10}\text{Fn3}$ домен содержит (i) AB, BC, CD, DE, EF и FG петли и аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к петлевым участкам с SEQ ID NO: 1, (ii) BC, DE и FG петли в $^{10}\text{Fn3}$ домене содержат аминокислотные последовательности:

- (a) SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 51, 52 и 53 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 66, 67 и 68 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 97, 98 и 99 соответственно и

(iii) полипептид специфично связывается с PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид связывается с PD-L1 с K_D , составляющей 500 мМ или менее, например 100 мМ или менее.

В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, изложенной в табл. 3, например, любой из SEQ ID NO: 5, 20, 35, 50, 65, 80, 96. В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9-15, 24-30, 39-45, 54-60, 69-75, 84-91, 100-105, и 107. В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к BC, DE и FG петлям участкам с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 9-15, 24-30, 39-45, 54-60, 69-75, 84-91, 100-107, 116-122, 127-133, 138-144, 150-155, 160-166,

171-177, 182-188, 193-199, 204-210, 215-221, 227-232, 237-243, 248-254, 259-265, 271-276, 291-287, 292-298, 303-309, 314-320, 325-331, 337-342, 347-353, 358-364, 369-375, 380-386, 391-397, 402-408, 413-419, 424-430, 435-441, 446-452, 457-463, 468-474, 479-485, 490-496, 501-507, 512-518, 523-529, 534-540, 545-551 и 556-562.

В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит N-концевую лидерную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 574-583, и/или C-концевую хвостовую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 584-618, или PmC_n , где P представляет собой пролин, и где m представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 0 (например, 0, 1 или 2), и n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, 1 или 2).

В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc домен иммуноглобулина или его фрагмент, трансферрина, сывороточного альбумина, и белка, связывающегося с сывороточным альбумином, где белок, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой антитело или аднектин. В соответствии с определенными вариантами осуществления ПК-фрагмент и полипептид связаны посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, пептидной связи, полипептида, полимерного сахара или полиэтиленгликолевого фрагмента. В соответствии с определенными вариантами осуществления ПК-фрагмент и полипептид связаны посредством линкера с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 629-678.

В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, а также векторы и клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-19, 31-34, 46-49, 61-64, 76-79, 92-95 и 108-111.

В данном документе представлены композиции, содержащие полипептиды, описанные в данном документе, и носитель. Например, композиции, описанные в данном документе, содержат полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 9-15, 20, 24-30, 35, 39-45, 50, 54-60, 65, 69-75, 80, 84-91, 96, 100-105, 107, и носитель.

В данном документе представлены визуализирующие средства, содержащие полипептид, раскрытый в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 9-15, 20, 24-30, 35, 39-45, 50, 54-60, 65, 69-75, 80, 84-91, 96, 100-105, 107.

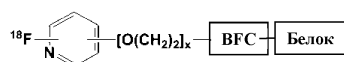
В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит выявляемую метку. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид, раскрытый в данном документе, хелатирующее средство и выявляемую метку. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид, раскрытый в данном документе, бифункциональный хелатирующий или конъюгирующий (BFC) фрагмент и выявляемую метку. В соответствии с определенными вариантами осуществления выявляемая метка представляет собой простетическую группу, содержащую радионуклид. В соответствии с определенными вариантами осуществления выявляемая метка может быть выявлена с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатирующее средство и/или бифункциональный хелатирующий или конъюгирующий (BFC) фрагмент выбраны из группы, состоящей из DFO, DOTA, CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, DBCO, DIBO, BARAC, DIMAC, оксо-DO3A, TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP, NOPO, AAZTA, DATA, H₂dedpa, H₄octapa, H₂azapa, H₅decapa, H₆phospa, HBED, SHBED, BPCA, CP256, PCTA, HEHA, PEPA, EDTA, TETA и TRITA.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выявляемая метка представляет собой радионуклид, например ⁶⁴Cu, ¹²⁴I, ^{76/77}Br, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, ⁶⁸Ga, ¹⁸F, ¹¹C, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹³¹I, ¹²³I, ³²Cl, ³³Cl, ³⁴Cl, ⁶⁸Ga, ⁷⁴Br, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁷⁸Br, ⁸⁹Zr, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁹Tc или ¹⁵³Sm.

В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатирующее средство представляет собой NODAGA, и радионуклид представляет собой ⁶⁴Cu. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид к PD-L1 (например, аднектин к PD-L1, описанный в данном документе, например, аднектин к PD-L1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 80 или 96), хелатирующее средство NODAGA и радионуклид ⁶⁴Cu.

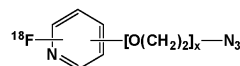
В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид к PD-L1 (например, аднектин к PD-L1, описанный в данном документе, например, аднектин к PD-L1, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 80 или 96), бифункциональный хелатирующий или конъюгирующий (BFC) фрагмент и простетическую группу, содержащую радионуклид ¹⁸F. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство имеет следующую структуру:



или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль, в которой

(а) ^{18}F находится во втором положении пиридинового кольца и x представляет собой целое число от 1 до 8;

(б) фрагмент BFC ковалентно связан с меченной радиоактивным изотопом ^{18}F простетической группой, где ковалентная связь образована 1,3-диполярным циклоприсоединением между азидом со следующей структурой:

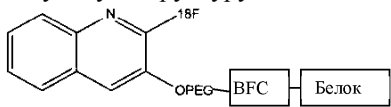


и циклооктиновой группой на BFC,

(с) BFC содержит спейсерный фрагмент полиэтиленгликоля $(\text{PEG})_y$, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где спейсерный фрагмент $(\text{PEG})_y$ содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминной, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой на белке; и

(д) белок представляет собой полипептид, как указано выше, или его фармацевтически приемлемая соль.

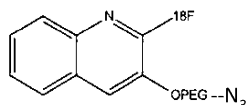
В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство содержит полипептид, меченую радиоактивным изотопом ^{18}F простетическую группу и бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент и имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где

(а) "OPEG" представляет собой $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ и x представляет собой целое число от 1 до 8,

(б) фрагмент BFC образует ковалентную связь с меченой радиоактивным изотопом ^{18}F простетической группой путем 1,3-диполярного циклоприсоединения между азидом со следующей структурой:



и циклооктиновой группой на BFC;

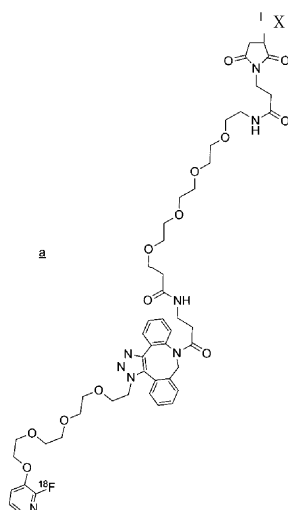
(с) BFC содержит спейсерный фрагмент полиэтиленгликоля $(\text{PEG})_y$, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где спейсерный фрагмент $(\text{PEG})_y$ содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминной, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой белка и

(д) "белок" представляет собой полипептид как указано выше.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления циклооктин выбран из группы, состоящей из дибензоциклооктина (DIBO), биарилазациклооктинона (BARAC), диметоксиазациклооктина (DIMAC) и дибензоциклооктина (DBCO). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления циклооктин представляет собой DBCO.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир, DBCO-сульфо-NHS-сложный эфир, DBCO-PEG4-кислоту, DBCO-PEG4-амин или DBCO-PEG4-малеимид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-малеимид.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство имеет структуру:



где X представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность с любой из SEQ ID NO: 13, 28, 43, 58, 73, 88, и 104. В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 88. В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 104.

В данном документе представлены наборы, содержащие композицию с аднектином к PD-L1 и/или визуализирующее средство, описанное в данном документе, а также инструкции к применению.

В данном документе представлен способ выявления PD-L1 в образце, причем способ предусматривает приведение образца в контакт с аднектином к PD-L1 и выявление PD-L1.

В данном документе представлен способ выявления положительных по PD-L1 клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1, и выявление визуализирующего средства, причем выявленное визуализирующее средство определяет положение положительных по PD-L1 клеток у субъекта.

В данном документе представлен способ выявления экспрессирующих PD-L1 опухолей у субъекта, предусматривающий введение субъекту визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1, и выявление визуализирующего средства, причем выявленное визуализирующее средство определяет положение опухоли у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство выявляют с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В данном документе представлен способ получения изображения визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1, причем способ предусматривает:

- a) введение субъекту визуализирующего средства и
- b) визуализацию *in vivo* распространения визуализирующего средства с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В данном документе представлен способ получения количественно оцениваемого изображения тканей или клеток, экспрессирующих PD-L1, причем способ предусматривает приведение клеток или ткани в контакт с визуализирующим средством, содержащим аднектин к PD-L1, и выявление или количественную оценку ткани, экспрессирующей PD-L1, с применением позитронно-эмиссионной томографии.

В данном документе представлен способ выявления экспрессирующей PD-L1 опухоли, предусматривающий введение эффективного для визуализации количества визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1, субъекту, имеющему экспрессирующую PD-L1 опухоль, и выявление радиоактивного излучения указанного визуализирующего средства в опухоли с применением позитронно-эмиссионной томографии, причем радиоактивное излучение выявляют в опухоли.

В данном документе представлен способ диагностики наличия экспрессирующей PD-L1 опухоли у субъекта, причем способ предусматривает:

- (a) введение субъекту, нуждающемуся в этом, визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1; и
 - (b) получение сформированного за счет радиоактивного излучения изображения по меньшей мере части субъекта для выявления наличия или отсутствия визуализирующего средства;
- причем наличие и положение визуализирующего средства на уровне выше фонового является показателем наличия и положения заболевания.

В данном документе представлен способ мониторинга прогресса противоопухолевой терапии в отношении экспрессирующих PD-L1 опухолей у субъекта, причем способ предусматривает:

- a) введение субъекту, нуждающемуся в этом, визуализирующего средства, содержащего аднектин к PD-L1 в первый момент времени, и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения размера опухоли;

- b) назначение субъекту противоопухолевой терапии;
- с) введение субъекту визуализирующего средства в один или несколько последующих моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени; причем размер и положение опухоли в каждый момент времени являются показателями прогресса заболевания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение коровых аминокислотных последовательностей иллюстративных аднектинов к PD-L1, описанных в данном документе. BC, DE и FG петли подчеркнуты. Дикий тип (WT) (SEQ ID NO: 2), ATI-968 (SEQ ID NO: 5), ATI-964 (SEQ ID NO: 20), ATI-967 (SEQ ID NO: 65), A02 (SEQ ID NO: 80), E01 (SEQ ID NO: 96), ATI-965 (SEQ ID NO: 35) и ATI-966 (SEQ ID NO: 50).

Фиг. 2 представляет собой схему химического синтеза $[^{18}\text{F}]\text{-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA}$. Часть E01 молекулы имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 104.

Фиг. 3 представляет собой график, демонстрирующий установление различий между положительными по hPD-L1 L2987 клетками и отрицательными по hPD-L1 HT-29 клетками с использованием ^{64}Cu -E01 аднектина к PD-L1 (с хелатором NODAGA). Специфичность подтверждалась снижением концентрации связавшегося с клеткой ^{64}Cu -E01 при совместном инкубировании с избытком "холодного" (немеченого) E01 аднектина.

Фиг. 4A представляет собой полученное с помощью PET изображение, иллюстрирующее установление различий между hPD-L1 (+) и hPD-L1 (-) опухолями у мышей с двухсторонними ксенотрансплантатами с использованием меченого NODAGA- ^{64}Cu A02 аднектина к PD-L1. Показаны наложенные изображения за период 0-2 ч, показывающие области, где находится зонд. Яркие области представляют собой ткани с наибольшей заполненностью в ходе воздействия.

Фиг. 4B представляет собой график, на котором изображена динамика мечения опухоли в hPD-L1 (+) [L2987] опухолях, hPD-L1(-) [HT29] опухоли и эксперимент с вытеснением метки в системах hPD-L1(+) [L2987 блокирование] показывают специфичность мечения.

Фиг. 5 представляет собой график, на котором изображено распределение в тканях радиоактивного маркера на основе меченого ^{18}F A02 аднектина к PD-L1 у мышей, несущих двухсторонние ксенотрансплантаты hPD-L1(+) L2987 и hPD-L1(-) HT-29, измеренное *ex vivo* с помощью счетчика гамма-частиц.

Фиг. 6 представляет собой составное изображение распределения меченого ^{18}F E01 аднектина к PD-L1 у яванского макака.

Фиг. 7 представляет собой изображение, на котором представлена *in vitro* авторадиграфия ксенотрансплантата и тканей человеческого легкого, меченных с использованием 0,25 нМ ^{18}F -DBCO-A02 аднектина к PD-L1, совместно инкубируемого с указанными концентрациями "холодного" A02 аднектина.

На фиг. 8 представлены полученные с помощью иммуногистохимического анализа изображения образцов ксенотрансплантатов и опухолей легкого человека, меченных с использованием аднектинов к PD-L1, для демонстрации экспрессии опухолью hPD-L1.

На фиг. 9 показана схема реакции синтеза $[^{18}\text{F}]\text{-A02-4PEG-DBCO-FPPEGA}$. Такую же схему реакции применяли для мечения E01 аднектина.

Фиг. 10 представляет собой схематическое изображение модуля для синтеза GE TRACERlab FX2 N для автоматизированного синтеза $[^{18}\text{F}]\text{-FPPEGA}$.

Фиг. 11 представляет собой схематическое изображение модуля для синтеза Synthra Synthesis module (IBA) для автоматизированного синтеза $[^{18}\text{F}]\text{-FPPEGA}$.

На фиг. 12 изображены иллюстративные кривые конкурентирования аднектинов к PD-L1.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники. Несмотря на то что любые способы и композиции, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, предпочтительные способы и композиции описаны в данном документе.

"Лиганд-1 белка программируемой клеточной гибели (PD-L1)" представляет собой один из двух гликопротеиновых лигандов клеточной поверхности для PD-1 (другой представляет собой PD-L2), который ослабляет активацию Т-клеток и секрецию ими цитокинов при связывании с PD-1. Используемый в данном документе термин "PD-L1" включает в себя человеческий PD-L1 (hPD-L1), варианты, изоформы и гомологи hPD-L1 из других видов, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Полную последовательность hPD-L1 можно найти под номером доступа в GenBank Q9NZQ7. PD-L1 также называется CD274, B7-H, B7H1, PDCD1L1 и PDCD1LG1.

"Полипептид" в контексте данного документа относится к любой последовательности из двух или более аминокислот вне зависимости от длины, посттрансляционной модификации или функции. "Полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо. Полипептиды могут включать в себя природные аминокислоты и аминокислоты, не встречающиеся в естественных условиях,

такие как описанные в патенте США № 6559126, включенном в данный документ посредством ссылки. Полипептиды также могут быть модифицированы любым из ряда стандартных химических способов (например, аминокислота может быть модифицирована защитной группой; карбоксиконцевая аминокислота может быть превращена в концевую амидную группу; аминоконцевой остаток может быть модифицирован группами, например, для усиления липофильности; или полипептид может быть химически гликозилированным или иным образом модифицированным для повышения стабильности или периода полувыведения *in vivo*). Модификации полипептида могут включать в себя прикрепление к полипептиду другой структуры, такой как циклическое соединение или другая молекула, 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, описанные в данном документе, представляют собой белки, полученные из десятого домена фибронектина типа III, который был модифицирован для того, чтобы специфично связываться с PD-L1, и они называются в данном документе "аднектин к PD-L1" или "PD-L1 аднектин".

"Полипептидная цепь" в контексте данного документа, относится к полипептиду, в котором каждый из его доменов соединен с другим(другими) доменом(доменами) посредством пептидной(пептидных) связи(связей), в отличие от нековалентных взаимодействий или дисульфидных связей.

"Выделенный" полипептид представляет собой полипептид, который был идентифицирован и отделен от компонентов его естественного окружения и/или выделен из них. Загрязняющие компоненты его естественного окружения представляют собой материалы, которые будут препятствовать диагностическим или терапевтическим применениям для полипептидов, и они могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В соответствии предпочтительными вариантами осуществления полипептид будет очищен (1) до более чем 95 вес.% полипептида при определении с помощью метода Лоури и наиболее предпочтительно до более чем 99 вес.%, (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при SDS-PAGE в восстановительных или невосстановительных условиях при использовании кумасси синего или, предпочтительно, серебряного красителя. Выделенный полипептид включает в себя полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, после того как в них не будет присутствовать по меньшей мере один компонент из естественного окружения полипептида. Тем не менее, обычно, выделенный полипептид будет получен с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

«Участок» $^{10}\text{Fn3}$ домена в контексте данного документа относится к любому из петли (AB, BC, CD, DE, EF и FG), β -нити (A, B, C, D, E, F и G), N-конца (соответствующего аминокислотным остаткам 1-7 в SEQ ID NO: 1) или C-конца (соответствующего аминокислотным остаткам 93-94 в SEQ ID NO: 1) человеческого $^{10}\text{Fn3}$ домена.

«Каркасный участок» относится к любому не относящемуся к петле участку человеческого $^{10}\text{Fn3}$ домена. Каркасный участок включает в себя A, B, C, D, E, F и G β -нити, а также N-концевой участок (аминокислоты, соответствующие остаткам 1-7 в SEQ ID NO: 1) и C-концевой участок (аминокислоты, соответствующие остаткам 93-94 в SEQ ID NO: 1 и необязательно содержащие 7 аминокислот, составляющих натуральный линкер между 10^{th} и 11^{th} повтором в Fn3 домене человеческого фибронектина).

"Процентная (%) идентичность аминокислотной последовательности" в данном документе определена как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые являются идентичными аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и не учитывает любые консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности можно осуществлять различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTARTM). Специалисты в данной области техники могут легко определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, участвующих в сравнении. Например, % идентичность аминокислотной последовательности для заданной аминокислотной последовательности A по отношению к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности B (что может быть альтернативно сформулировано как заданная аминокислотная последовательность A, которая имеет или характеризуется определенной % идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности B) рассчитывается следующим образом: умноженное на 100 отношение X/Y, где X представляет собой число аминокислотных остатков, подсчитанных как идентичные совпадения при выравнивании последовательности с помощью программы ALIGN-2, при котором программа осуществляет выравнивание A и B, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в B. Будет понятно, что в случае, когда длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичность аминокислотной последовательности A к B не будет равной % идентичности аминокислотной последователь-

ности В к А.

Используемый в данном документе термин «сайт связывания аднектина» относится к сайту или части белка (например, PD-L1), который взаимодействует или связывается с конкретным аднектином. Сайты связывания аднектина могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, располагающихся рядом при сворачивании белка в третичную структуру. Сайты связывания аднектина, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как сайты связывания аднектина, образованные при сворачивании в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями.

Сайт связывания аднектина для аднектина к PD-L1, описанного в данном документе, может быть определен с применением стандартных методик, как правило, используемых для картирования эпитопов для антител, в том числе без ограничения картирования с использованием протеазы и мутационного анализа. В качестве альтернативы, сайт связывания аднектина можно определить с помощью конкурентного анализа с использованием эталонного аднектина или антитела, которые связываются с таким же полипептидом, например PD-L1 (как дополнительно описано ниже в разделе "Перекрестно конкурирующие аднектины и/или аднектины, которые связываются с тем же сайтом связывания аднектина". Если исследуемый аднектин и эталонная молекула (например, другой аднектин или антитело) конкурируют, то они связываются с тем же сайтом связывания аднектина или с сайтами связывания аднектина, достаточно близкими, в результате чего связывание одной молекулы препятствует связыванию другой.

Термины "специфично связывается", "специфичное связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", используемые взаимозаменяемо в данном документе в контексте аднектинов, связывающихся с PD-L1, относятся к аднектину который проявляет аффинность в отношении PD-L1, но не связывается в значительной степени (например, связывается менее чем приблизительно на 10%) с отличающимися полипептидами при измерении с помощью методики, доступной в уровне техники, такой как без ограничения анализ по Скэтчарду и/или конкурентные анализы связывания (например, конкурентный анализ ELISA, анализ BIACORE). Данный термин также применим в том случае, когда, например, связывающий домен аднектина, описанного в данном документе, является специфичным в отношении PD-L1.

Термин "преимущественно связывается", используемый в данном документе в контексте аднектинов, связывающихся с PD-L1, относится к ситуации, при которой аднектин, описанный в данном документе, связывается с PD-L1 по меньшей мере приблизительно на 20% больше, чем он связывается с отличающимся полипептидом при измерении с помощью методики, доступной в уровне техники, такой как без ограничения анализ по Скэтчарду и/или конкурентные анализы связывания (например, конкурентный анализ ELISA, анализ BIACORE).

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

Термин " K_D ", используемый в данном документе в контексте аднектинов, связывающихся с PD-L1, как предполагается, относится к константе равновесия при диссоциации для конкретного взаимодействия аднектин-белок (например, PD-L1) или к аффинности аднектина в отношении белка (например, PD-L1), которую измеряют с использованием анализа методом поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. "Желательная K_D " в контексте данного документа относится к K_D аднектина, которая является достаточной для предполагаемых целей. Например, желательная K_D может относиться к K_D для аднектина, требующейся для того, чтобы вызвать функциональный эффект в *in vitro* анализе, например клеточном анализе с использованием люциферазы.

Термин " k_a ", используемый в данном документе в контексте аднектинов, связывающихся с белком, как предполагается, относится к константе скорости ассоциации для ассоциации аднектина в комплекс аднектин/белок.

Термин " k_d ", используемый в данном документе в контексте аднектинов, связывающихся с белком, как предполагается, относится к константе скорости диссоциации для диссоциации аднектина из комплекса аднектин/белок.

Термин " IC_{50} ", используемый в данном документе в контексте аднектинов, относится к концентрации аднектина, которая ингибирует ответ либо в *in vitro*, либо в *in vivo* анализе до уровня, который составляет 50% от ответа при максимальном ингибировании, т.е. находится посередине между ответом при максимальном ингибировании и ответом при отсутствии обработки.

Термин "РК" представляет собой сокращение от "фармакокинетический" и охватывает свойства соединения, в том числе, к примеру, абсорбцию, распространение, метаболизм и выведение из организма субъекта. "РК-модулирующий белок" или "РК-фрагмент" в контексте данного документа относится к любому белку, пептиду или фрагменту, который оказывает воздействие на фармакокинетические свойства биологически активной молекулы при слиянии с биологически активной молекулой или при введении вместе с биологически активной молекулой. Примеры РК-модулирующего белка или РК-фрагмента включают в себя PEG, связывающие средства на основе человеческого сывороточного альбумина (HSA) (которые раскрыты в публикациях заявок на патент США № 2005/0287153 и № 2007/0003549, РСТ пуб-

ликациях международных заявок № WO 2009/083804 и № WO 2009/133208), человеческий сывороточный альбумин и его варианты, трансферрин и его варианты, Fc или фрагменты Fc и их варианты, а также сахара (например, сиаловую кислоту).

"Период полувыведения из сыворотки" белка или соединения представляет собой время, требующееся для того, чтобы концентрация полипептида в сыворотке снижалась на 50% *in vivo*, например, вследствие разрушения последовательности или соединения и/или выведения или секвестрации последовательности или соединения с помощью природных механизмов. Период полувыведения можно определить любым способом, по существу известным, как например, с помощью фармакокинетического анализа. Подходящие методики будут понятны специалисту в данной области техники и обычно могут включать, например, стадии введения субъекту соответствующим образом подходящей дозы аминокислотной последовательности или соединения, описанных в данном документе; сбора образцов крови или других образцов у субъекта с равномерными интервалами; определения уровня или концентрации аминокислотной последовательности или соединения, описанных в данном документе, в указанном образце крови и расчета на основании данных (графика), полученных при этом, времени, за которое уровень или концентрация аминокислотной последовательности или соединения, описанных в данном документе, снизились на 50% по сравнению с исходным уровнем при введении дозы. Могут быть упомянуты, например, стандартные руководства, такие как Kenneth A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*; и в Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Также можно упомянуть Gibaldi M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Период полувыведения 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 "повышение периода полувыведения" относится к повышению любого из этих параметров, любых двух из этих параметров, любых трех из этих параметров или всех четырех из этих параметров. «Повышение периода полувыведения», в частности, относится к повышению $t_{1/2}$ -бета и/или $HL_{\lambda z}$ либо с повышением, либо без повышения $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или обоих из них.

Термин «выявляемый» относится к способности выявлять сигнал относительно фонового сигнала. Термин «выявляемый сигнал» представляет собой сигнал, полученный в результате неинвазивных методов визуализации, таких как без ограничения позитронно-эмиссионная томография (ПЕТ). Выявляемый сигнал можно выявить и отделить от других фоновых сигналов, которые могут генерироваться у субъекта. Иными словами, существует измеримое и статистически значимое различие между выявляемым сигналом и фоновым уровнем (например, статистически значимое различие является достаточным различием для того, чтобы установить отличие между выявляемым сигналом и фоновым уровнем, как например, приблизительно 0,1, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40% или большее отличие между выявляемым сигналом и фоновым уровнем). Стандарты и/или калибровочные кривые можно применять для определения относительной интенсивности выявляемого сигнала и/или фонового уровня.

"Эффективное для выявления количество" композиции, содержащей визуализирующее средство, описанное в данном документе, определено как количество, достаточное для получения приемлемого изображения с применением оборудования, которое доступно для клинического применения. Эффективное для выявления количество визуализирующего средства, представленного в данном документе, можно вводить в виде более чем одной инъекции. Эффективное для выявления количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как степень чувствительности индивида, возраст, пол и масса индивида, идиосинкразические реакции индивида и т.п. Эффективные для выявления количества визуализирующих композиций также могут варьировать в зависимости от применяемого инструмента и методов. Оптимизация таких факторов находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство для PD-L1, например, описанное в данном документе, обеспечивает установление различия (т.е. различия между специфическим сигналом и фоновым сигналом), которое является 2-кратным или большим, например, 3-, 4-, 5-кратным или большим.

Термин "биоортогональная химия" относится к любой химической реакции, которая происходит внутри живых систем, не препятствуя нативным биохимическим процессам. Термин включает в себя химические реакции, которые представляют собой химические реакции, которые происходят *in vitro* при физиологическом pH в воде или в присутствии воды. Чтобы реакции считались биоортогональными, они должны являться селективными и обеспечивать избежание побочных реакций с другими функциональными группами, находящимися в исходных соединениях. Кроме того, образующаяся в результате ковалентная связь между партнерами по реакции должна быть крепкой и химически инертной для биологических реакций, и она не должна оказывать воздействие на биологическую активность желаемой молекулы.

Термин "клик-химия" относится к набору надежных и селективных биоортогональных реакций для быстрого синтеза новых соединений и комбинаторных библиотек. Свойства клик-реакций включают в себя модульность, широту охвата, высокий выход, стереоспецифичность и простое выделение продуктов (отделение от инертных побочных продуктов с помощью методов, не относящихся к хроматографии) для получения соединений, которые являются стабильными при физиологических условиях. В радиохимии и

радиофармакологии клик-химия представляет собой общий термин для набора реакций мечения, в которых используются селективные и модульные строительные блоки и обеспечиваются реакции хемоселективного лигирования с радиоактивной меткой биологически релевантных соединений в отсутствие катализаторов. "Клик-реакция" может осуществляться с медью или она может представлять собой клик-реакцию без меди.

Термин "простетическая группа" или "бифункциональное средство для мечения" относится к малой органической молекуле, содержащей радионуклид (например, ^{18}F), который способен связываться с пептидами или белками.

Термин "хелатирующий лиганд", используемый в данном документе в отношении радиофармацевтического химического средства, относится к бифункциональному хелатирующему или конъюгирующему (BFC) фрагменту, причем данные термины используются в данном документе взаимозаменяемо, который ковалентно связывает меченую радиоактивным изотопом простетическую группу с биологически активной нацеливающей молекулой (например, пептидом или белком). В BFC используются такие функциональные группы, как карбоновые кислоты или активированные сложные эфиры для реакций амидного сочетания, изотиоцианаты для реакций тиомочевинного сочетания и малеимиды для реакций тиольного сочетания.

Термины "индивид", "субъект" и "пациент", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к животному, предпочтительно млекопитающему (в том числе не относящемуся к приматам и примату), например человеку. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект имеет заболевание, или нарушение, или состояние, на которое будет оказывать благоприятное воздействие пониженный уровень или пониженная биологическая активность PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект имеет риск развития нарушения, заболевания или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие пониженный уровень PD-L1 или пониженная биологическая активность PD-L1.

"Злокачественная опухоль" относится к обширной группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят в результате к образованию злокачественных опухолей, которые внедряются в прилегающие ткани, а также могут метастазировать в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровотоки.

"Иммунная реакция" относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, клеток-натуральных киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любыми из этих клеток или печени (в том числе Ab, цитокины и компоненты комплемента), которое приводит в результате к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного проникших патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других ненормальных клеток или, в случаях аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

"Иммунорегулятор" относится к веществу, средству, пути передачи сигнала или его компоненту, которые регулируют иммунную реакцию. "Регуляция", "модификация" или "модуляция" иммунной реакции относится к любому изменению в клетке иммунной системы или изменению активности такой клетки. Такая регуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которые могут проявляться как повышение или снижение числа различных типов клеток, повышение или снижение активности этих клеток или любые другие изменения, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммунорегуляторы, некоторые из которых усиленно функционируют в микроокружении злокачественной опухоли.

Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием или имеющего риск заражения, или страдающего от рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунной реакции.

"Лечение" или "терапия" у субъекта относится к любому типу вмешательства или процесса, осуществляемого в отношении субъекта, или к введению активного средства субъекту с целью обеспечения регрессии, облегчения, ослабления, ингибирования, замедления или предупреждения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

Термины "введение" или "осуществление введения", используемые в данном документе в контексте аднектинов к PD-L1, относятся к введению субъекту PD-L1 аднектина, или зонда на основе PD-L1 аднектина, или меченого зонда (также называемого "визуализирующим средством"), описанного в данном документе. Подходящим является любой путь введения, такой как внутривенный, пероральный, местный, подкожный, перитонеальный, внутриартериальный, ингаляционный, вагинальный, ректальный, назальный, введение в спинномозговую жидкость, или может применяться инстилляционная в части организма.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к дозе, которая является не меньшей, чем минимальная, но меньшей, чем токсичная доза средства, и которая необходима для обеспечения терапевтического благоприятного воздействия на субъекта.

В контексте данного документа "эффективное количество" относится к количеству, которое является не меньшим, чем эффективное количество для достижения желаемого результата в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени.

В контексте данного документа "достаточное количество" относится к количеству, достаточному для достижения желаемого результата.

В контексте данного документа "позитронно-эмиссионная томография" или "PET" относится к неинвазивной методике медицинской радиологии, с помощью которой получают трехмерное изображение положения маркера в организме. В данном методе выявляют пары гамма-лучей, излучаемых непосредственно позитронно-активным радионуклидом (маркером), который вводят в организм на биологически активной молекуле. Инструменты для визуализации с помощью PET имеют широкий спектр применений и помогают в разработке лекарственных средств как в доклинических, так и в клинических условиях. Иллюстративные применения включают в себя непосредственную визуализацию насыщенности мишеней *in vivo*; мониторинг поглощения в нормальных тканях для прогнозирования токсичности или вариации среди пациентов; количественную оценку пораженной заболеванием ткани; метастазирования опухоли; и мониторинг эффективности лекарственного средства со временем или возникновения устойчивости со временем.

Обзор

В данном документе представлены полипептиды, которые связываются с человеческим PD-L1 и могут быть связаны с гетерологичной(гетерологичными) молекулой(молекулами), такими как радиоактивная метка. Такие полипептиды являются полезными, например, для выявления PD-L1 в образце или ткани (например, ткани, такой как ткань злокачественной опухоли, которая селективно экспрессирует PD-L1) для диагностических анализов.

Настоящее изобретение основывается на разработке средства для неинвазивной клинической визуализации, которое обеспечивает визуализацию экспрессии PD-L1 во всем организме пациента. В соответствии с определенными вариантами осуществления однодневные процедуры «виртуальной биопсии» всего организма пациента осуществляют для мониторинга и локализации уровней экспрессии PD-L1. Визуализирующие средства для PD-L1, описанные в данном документе, можно применять для получения высококонтрастной виртуальной биопсии всего организма за один день.

I. Каркасы на основе фибронектина

F_n3 относится к домену типа III из фибронектина. F_n3 домен является небольшим, мономерным, растворимым и стабильным. У него отсутствуют дисульфидные связи, и, следовательно, он является стабильным в восстановительных условиях. Общая структура F_n3 подобна укладке цепи иммуноглобулина. F_n3 домены содержат, в порядке от N-конца к C-концу, бета- или бета-подобную нить, A; петлю, AB; бета- или бета-подобную нить, B; петлю, BC; бета- или бета-подобную нить, C; петлю, CD; бета- или бета-подобную нить, D; петлю, DE; бета- или бета-подобную нить, E; петлю, EF; бета-или бета-подобную нить, F; петлю, FG; и бета- или бета-подобную нить, G. Семь антипараллельных Р-нитей расположены в виде двух складчатых бета-слоев, которые образуют стабильный кор, создавая при этом две "поверхности", состоящие из петель, которые соединяют бета- или бета-подобные нити. Петли AB, CD и EF расположены с одной стороны ("южный полюс"), и петли BC, DE и FG расположены на противоположной стороне ("северный полюс"). Существует по меньшей мере 15 разных F_n3 модулей в человеческом фибронектине, и хотя гомология последовательности у модулей является низкой, все они характеризуются высоким подобием третичной структуры.

В данном документе описаны аднектины к PD-L1, содержащие F_n3 домен, в котором одна или несколько из доступных растворителю петель были рандомизированы или мутированы. В соответствии с определенными вариантами осуществления F_n3 домен представляет собой F_n3 домен, полученный из десятого модуля домена дикого типа человеческого фибронектина типа III (¹⁰F_n3):

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFVPGSKSTA

TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1)

(94 аминокислоты; AB, CD и EF петли выделены подчеркиванием; коровый ¹⁰F_n3 домен начинается с аминокислоты 9 ("E") и заканчивается аминокислотой 94 ("T"), и соответствует 86 аминокислотному полипептиду). Коровый человеческий ¹⁰F_n3 домен дикого типа изложен в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления не связывающиеся с лигандом последовательности ¹⁰F_n3, т.е. "каркас ¹⁰F_n3", могут быть изменены при условии, что ¹⁰F_n3 сохраняет функцию связывания с лигандом и/или структурную стабильность. Сообщалось о ряде мутантных каркасов ¹⁰F_n3. В соответствии с одним аспектом один или несколько из Asp 7, Glu 9 и Asp 23 заменены на другую аминокислоту, такую как, например, не заряженный отрицательно аминокислотный остаток (например, Asn, Lys и т.д.). Был раскрыт ряд дополнительных изменений в каркасе ¹⁰F_n3, которые являются либо полезными, либо нейтральными. См., 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 белки ¹⁰F_n3 дикого типа характеризуются такой же структурой, а именно последовательностями домена из семи бета-нитей, обозначаемыми от A до G и шестью участками петель

(AB петля, BC петля, CD петля, DE петля, EF петля и FG петля), которые соединяют последовательности домена из семи бета-нитей. Бета-нити, расположенные ближе всего к N- и C-концам, могут принимать бета-подобную конформацию в растворе. В SEQ ID NO: 1 AB петля соответствует остаткам 14-17, BC петля соответствует остаткам 23-31, CD петля соответствует остаткам 37-47, DE петля соответствует остаткам 51-56, EF петля соответствует остаткам 63-67 и FG петля соответствует остаткам 76-87.

Соответственно, в соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1, описанный в данном документе, представляет собой полипептид $^{10}\text{Fn3}$, который по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичен человеческому $^{10}\text{Fn3}$ домену, приведенному в SEQ ID NO: 1, или его коровой последовательности, которая приведена в SEQ ID NO: 2. Большая часть вариативности обычно встречается в одной или нескольких из петель или одной или нескольких из бета-нитей или N- или C-концевых участков. Каждая из бета- или бета-подобных нитей в полипептиде 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 нити в SEQ ID NO: 1 или 2 при условии, что такая вариация не нарушает стабильность полипептида в физиологических условиях.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящим изобретением предполагается аднектин к человеческому PD-L1, содержащий десятый фибронектиновый домен типа III ($^{10}\text{Fn3}$), причем $^{10}\text{Fn3}$ домен содержит петлю AB; петлю BC; петлю CD; петлю DE; петлю EF и петлю FG и имеет по меньшей мере одну петлю, выбранную из BC, DE и FG петли с измененной аминокислотной последовательностью по сравнению с последовательностью соответствующей петли в человеческом Fn3 домене. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, содержат $^{10}\text{Fn3}$ домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к петлям участкам в SEQ ID NO: 1 или 2, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, является измененной. В соответствии с определенными вариантами осуществления BC и FG петли являются измененными, в соответствии с определенными вариантами осуществления BC и DE петли являются измененными, в соответствии с определенными вариантами осуществления DE и FG петли являются измененными, и в соответствии с определенными вариантами осуществления BC, DE и FG петли являются измененными, т.е. $^{10}\text{Fn3}$ домены содержат петли, не встречающиеся в естественных условиях. В соответствии с определенными вариантами осуществления AB, CD и/или EF петли являются измененными. Под термином "измененный" подразумеваются одно или несколько изменений аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью (соответствующей домену человеческого фибронектина), и термин включает в себя добавления, делеции, замены аминокислот или их комбинацию. Изменение аминокислотной последовательности может быть осуществлено посредством намеренного, произвольного или спонтанного изменения последовательности, обычно кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты, и оно может быть выполнено с помощью любой методики, например, ПЦР, ПЦР с внесением ошибок или химического синтеза ДНК.

В соответствии с определенными вариантами осуществления длину одной или нескольких петель, выбранных из BC, DE и FG, можно увеличить или сократить по сравнению с соответствующей петлей человеческого фибронектина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления длина петли может быть увеличена на 2-25 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления длина петли может быть уменьшена на 1-11 аминокислот. С целью оптимизации связывания с антигеном может быть изменена длина, а также последовательность петли $^{10}\text{Fn3}$ для получения наибольшей возможной гибкости и аффинности при связывании с антигеном.

В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид содержит Fn3 домен, который содержит аминокислотную последовательность не относящихся к петлям участков, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична не относящимся к петлям участкам в SEQ ID NO: 1 или 2, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, является измененной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления измененная BC петля имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен аминокислот, до 1, 2, 3 или 4 делеций аминокислот, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 вставок аминокислот или их комбинацию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько остатков интегрин-связывающего мотива "аргинин-глицин-аспарагиновая кислота" (RGD) (аминокислоты 78-80 в SEQ ID NO: 1) могут быть заменены для того, чтобы нарушить связывание с интегрином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления FG петля в полипептидах, представленных в данном документе, не содержит RGD сайт связывания интегрин. В соответствии с одним вариантом осуществления последовательность RGD заменена на последовательность из полярной аминокислоты-нейтральной аминокислоты-кислотной аминокислоты (в направлении от N-конца к C-концу). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность RGD заменена на SGE. В соответствии с одним вариантом осуществления последовательность RGD заменена на RGE.

В соответствии с определенными вариантами осуществления каркасный белок на основе фибронектина содержит $^{10}\text{Fn3}$ домен, который, в целом, определяется следующей последовательностью:

EVVAA(Z)_aLLISW(Z)_xYRITY(Z)_bFTV(Z)_yATISGL(Z)_cYTITVYA(Z)_dISINYRT (SEQ ID NO: 3),

где AB петля представлена (Z)_a, CD петля представлена (Z)_b, EF петля представлена (Z)_c, BC петля представлена (Z)_x, DE петля представлена (Z)_y, и FG петля представлена (Z)_z. Z представляет собой любую аминокислоту и нижний индекс после Z представляет собой целое число, обозначающее количество аминокислот. В частности, a может представлять собой примерно 1-15, 2-15, 1-10, 2-10, 1-8, 2-8, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3 или 1-2 аминокислоты; и каждый из b, c, x, y и z может независимо представлять собой примерно 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 или 6-7 аминокислот. Последовательности бета-нитей могут иметь примерно 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 замены, делеции или добавления по всем 7 каркасным участкам по сравнению с соответствующими аминокислотами, приведенными в SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательности бета-нитей могут иметь примерно 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 консервативной замены по всем 7 каркасным участкам по сравнению с соответствующими аминокислотами, приведенными в SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления коровые аминокислотные остатки являются неизменными, и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят по остаткам, отличающимся от коровых аминокислотных остатков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, имеют в основе каркас ¹⁰F_n3 и, в целом, определяются последовательностью:

EVVAATPTSLISW(Z)_xYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)_yATISGLKPGVDYTITVYA(Z)_dISINYRT (SEQ ID NO: 4),

где BC петля представлена (Z)_x, DE петля представлена (Z)_y, и FG петля представлена (Z)_z. Z представляет собой любую аминокислоту, и нижний индекс после Z представляет собой целое число, обозначающее количество аминокислот. В частности, каждый из x, y и z может независимо представлять собой примерно 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 или 6-7 аминокислот. В соответствии предпочтительными вариантами осуществления x представляет собой 11 аминокислот, y представляет собой 6 аминокислот, и z представляет собой 12 аминокислот. Последовательности бета-нитей могут иметь примерно 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 замены, делеции или добавления по всем 7 каркасным участкам по сравнению с соответствующими аминокислотами, приведенными в SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательности бета-нитей могут иметь примерно 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 одной консервативной замены по всем 7 каркасным участкам по сравнению с соответствующими аминокислотами, приведенными в SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления коровые аминокислотные остатки, например, вне одной или нескольких петель, являются неизменными, и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят по остаткам, отличающимся от коровых аминокислотных остатков.

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 одной консервативной замены по всем 7 каркасным участкам по сравнению с соответствующими аминокислотами, приведенными в SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с определенными вариантами осуществления коровые аминокислотные остатки, например, вне одной или нескольких петель, являются неизменными, и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят по остаткам, отличающимся от коровых аминокислотных остатков.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 может содержать последовательность, которая изложена в SEQ ID NO: 3 или 4, причем по меньшей мере одна из BC, DE и FG петель, которые представлены (Z)_x, (Z)_y и (Z)_z, соответственно, является измененной. Как описано выше, аминокислотные остатки, соответствующие остаткам 23-31, 51-56 и 76-87 в SEQ ID NO: 1, определяют BC, DE и FG петли, соответственно. Тем не менее, следует понимать, что не каждый остаток в пределах участка петли необходимо модифицировать с целью получения связывающего средства на основе ¹⁰F_n3, характеризующегося сильной аффинностью в отношении желаемой мишени (например, PD-L1).

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3 или 4, причем BC, DE и FG петли, которые представлены (Z)_x, (Z)_y и (Z)_z, соответственно, имеют аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичные последовательностям BC, DE или FG петель, изложенным в SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3 или 4, причем BC, DE и FG петли, которые представлены (Z)_x, (Z)_y и (Z)_z, соответственно, содержат BC, DE и FG петли, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3 или 4, причем BC, DE и FG петли, которые представлены (Z)_x, (Z)_y и (Z)_z, соответственно, имеют аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичные последовательностям BC, DE или FG петель, изложенным в SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3 или 4, причем BC, DE и FG петли, которые представлены (Z)_x,

ветственно; SEQ ID NO: 454, 455 и 456 соответственно; SEQ ID NO: 465, 466 и 467 соответственно; SEQ ID NO: 476, 477 и 478 соответственно; SEQ ID NO: 487, 488 и 489 соответственно; SEQ ID NO: 498, 499 и 500 соответственно; SEQ ID NO: 509, 510 и 511 соответственно; SEQ ID NO: 520, 521 и 522 соответственно; SEQ ID NO: 531, 530 и 531 соответственно; SEQ ID NO: 542, 543 и 544 соответственно; SEQ ID NO: 553, 554 и 555 соответственно; или SEQ ID NO: 564, 565 и 566 соответственно. Каркасные участки таких аднектинов к PD-L1 могут содержать примерно 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 замены, консервативной замены, делеции или добавления по сравнению с каркасными аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4. Такие модификации каркаса могут быть произведены при условии, что аднектин к PD-L1 способен к связыванию с PD-L1 с желаемой K_D .

В соответствии с определенными вариантами осуществления BC петля в аднектине к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 6, 21, 36, 51, 66, 81 и 97.

В соответствии с определенными вариантами осуществления DE петля в аднектине к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 7, 22, 37, 52, 67, 82 и 98.

В соответствии с определенными вариантами осуществления FG петля в аднектине к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из 8, 23, 38, 53, 68, 83 и 99.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность BC, DE и FG петли, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 6, 21, 36, 51, 66, 81 и 97; 7, 22, 37, 52, 67, 82 и 98; и 8, 23, 38, 53, 68, 83 и 99 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, 20, 35, 50, 65, 80, 96, 112, 123, 134, 145, 156, 167, 178, 189, 200, 211, 222, 233, 244, 255, 266, 277, 288, 299, 310, 321, 332, 343, 354, 365, 376, 387, 398, 409, 420, 431, 442, 453, 464, 475, 486, 497, 508, 519, 530, 541, 552 и 563.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к BC, DE и FG петлям участкам с SEQ ID NO: 5, 20, 35, 50, 65, 80 или 96.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 9-15, 24-30, 39-45, 54-60, 6975, 84-91, 100-107, 116-122, 127-133, 138-144, 150-155, 160-166, 171-177, 182-188, 193-199, 204-210, 215-221, 227-232, 237-243, 248-254, 259-265, 271-276, 291-287, 292-298, 303-309, 314-320, 325-331, 337-342, 347-353, 358-364, 369-375, 380-386, 391-397, 402-408, 413-419, 424-430, 435-441, 446-452, 457-463, 468-474, 479-485, 490-496, 501-507, 512-518, 523-529, 534-540, 545-551 и 556-562. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к BC, DE и FG петлям участкам в любой из SEQ ID NO: 9-15, 24-30, 39-45, 54-60, 6975, 84-91 и 100-107.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 51, 52 и 53 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 66, 67 и 68 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит BC, DE и FG петли, которые изложены в SEQ ID NO: 97, 98 и 99 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аминокислотные последовательности BC, DE и/или FG петель, описанные в данном документе (например, SEQ ID NO: 6, 21, 36, 51, 66, 81 и 97; 7, 22, 37, 52, 67, 82 и 98; и 8, 23, 38, 53, 68, 83 и 99, соответственно), привиты на каркасы из белков, не имеющих 10 Fn3 домен. Например, аминокислотные последовательности одной или нескольких петель заменяют одну или несколько петель CDR тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента или вставлены в них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен белка, в который вводятся в виде замены аминокислотные последовательности одной или нескольких петель, или в который они вставлены, включает в себя без ограничения консенсусные Fn3 домены (Centocor, США), белки с анкириновыми повторами (Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария), доменные антитела (Domantis,

Ltd, Кембридж, Массачусетс), однодоменные нанотела верблюдовых (Ablynx, Бельгия), липокалины (например, антикалины; Pieris Proteolab AG, Фрайзинг, Германия), авимеры (Amgen, Калифорния), аффите-ла (Affibody AG, Швеция), убиквитин (например, аффилины; Scil Proteins GmbH, Галле, Германия), белки-миметики эпителий (Polyphor Ltd, Аппельвил, Швейцария), каркасы в виде пучков спиралей (например, альфатела, Complix, Бельгия), SH3 домены Fyn (Covagen AG, Швейцария) или атримеры (Anaphor, Inc., Калифорния).

В соответствии с определенными вариантами осуществления аминокислотные последовательности N-концевого и/или C-концевого участков полипептидов, представленных в данном документе, могут быть модифицированы посредством делеции, замены или вставки по сравнению с аминокислотными последовательностями соответствующих участков человеческого ¹⁰Fn3 домена дикого типа (SEQ ID NO: 1 или 2). ¹⁰Fn3 домены обычно начинаются с аминокислоты номер 1 в SEQ ID NO: 1. Тем не менее, домены с делециями аминокислот также охватываются настоящим изобретением. Дополнительные последовательности также могут быть добавлены к N- или C-концу ¹⁰Fn3 домена, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления N-концевое продолжение состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: M, MG и G. В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательность MG может быть помещена на N-конец ¹⁰Fn3, определяемого SEQ ID NO: 1. M обычно будет отщепляться, оставляя G на N-конце. Кроме того, M, G или MG также могут быть помещены с N-концевой стороны по отношению к N-концевым продолжениям, приведенным в табл. 3.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления альтернативный N-концевой участок, имеющий длину 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота, может быть добавлен к N-концевому участку в SEQ ID NO: 1 или 2 или к любому аднектину, изложенному в табл. 3. Иллюстративные альтернативные N-концевые участки включают в себя (представленные однобуквенным кодовым обозначением для аминокислот) M, MG, G, MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 574) и GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 575). Другие подходящие альтернативные N-концевые участки, которые могут быть связаны, например, с N-концом коровой последовательности аднектина, включают в себя, например, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 576), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 577), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 578), X_nPRDL (SEQ ID NO: 579), X_nRDL (SEQ ID NO: 580), X_nDL (SEQ ID NO: 581) или X_nL, где n = 0, 1 или 2 аминокислоты, где в случае, когда n = 1, X представляет собой Met или Gly, а когда n = 2, X представляет собой Met-Gly. В случае, когда последовательность Met-Gly добавлена к N-концу ¹⁰Fn3 домена, M обычно будет отщепляться, оставляя G на N-конце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления альтернативный N-концевой участок содержит аминокислотную последовательность MASTSG (SEQ ID NO: 582).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления альтернативный C-концевой участок, имеющий длину 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота, может быть добавлен к C-концевому участку в SEQ ID NO: 1 или 2 или к любому аднектину, изложенному в табл. 3. Конкретные примеры последовательностей альтернативного C-концевого участка включают в себя, например, полипептиды, содержащие, состоящие, по существу, из или состоящие из EIEK (SEQ ID NO: 584), EGSGC (SEQ ID NO: 585), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 586), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 587), EIEKP (SEQ ID NO: 588), EIEKPS (SEQ ID NO: 589) или EIEKPC (SEQ ID NO: 590). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления альтернативный C-концевой участок содержит EIDK (SEQ ID NO: 591), и в соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный C-концевой участок представляет собой либо EIDKPCQ (SEQ ID NO: 592), либо EIDKPSQ (SEQ ID NO: 593). Дополнительные подходящие альтернативные C-концевые участки изложены в SEQ ID NO: 594-618.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин связан с C-концевым продолжением последовательности, которая содержит остатки E и D и может иметь длину от 8 до 50, от 10 до 30, от 10 до 20, от 5 до 10 и от 2 до 4 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хвостовые последовательности включают в себя линкеры на основе ED, в которых последовательность содержит тандемные повторы ED. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления хвостовая последовательность содержит 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 или 5 ED повторов. В соответствии с определенными вариантами осуществления хвостовые последовательности на основе ED также могут включать в себя дополнительные аминокислотные остатки, такие как, например: EI, EID, ES, EC, EGS и EGC. Такие последовательности имеют в основе, частично, известные хвостовые последовательности аднектинов, такие как EIDKPSQ (SEQ ID NO: 593), в которых были удалены остатки D и K. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления хвостовая последовательность на основе ED содержит остатки E, I или E1 перед ED повторами.

В соответствии с определенными вариантами осуществления последовательности N- или C-концевого продолжения связаны с последовательностями аднектина к PD-L1 с использованием известных линкерных последовательностей (например, SEQ ID NO: 629-678 в табл. 3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности могут быть расположены на C-конце ¹⁰Fn3 домена для облегчения прикреплению фармакокинетического фрагмента. Например, линкер, содержащий цистеин, такой как GSGC (SEQ ID NO: 638), может быть добавлен к C-концу для облегчения сайт-направленного пегилирования по цистеиновому остатку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент, который может быть связан с С-концевыми аминокислотами RT (т.е. аминокислотой 94), содержит аминокислоты P_mX_n , где Р представляет собой пролин, Х представляет собой любую аминокислоту, m представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 1, и n равно 0 или представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент содержит аминокислоты PC. В соответствии с определенными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент содержит аминокислоты PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 605), PIEK (SEQ ID NO: 606), PIDKP (SEQ ID NO: 607), PIEKP (SEQ ID NO: 608), PIDKPS (SEQ ID NO: 609), PIEKPS (SEQ ID NO: 610), PIDKPC (SEQ ID NO: 611), PIEKPC (SEQ ID NO: 612), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 613), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 614), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 615), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 616), PNNNNN (SEQ ID NO: 617) и PCHNNNNN (SEQ ID NO: 618). Иллюстративные аднектины к PD-L1, имеющие PC на своем С-конце, представлены в разделе Примеры и в табл. 3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины, описанные в данном документе, имеют хвостовую последовательность из 6X his (SEQ ID NO: 619).

В соответствии с определенными вариантами осуществления каркасные белки на основе фибронектина содержат 10 Fn3 домен, имеющий как последовательность альтернативного N-концевого участка, так и последовательность альтернативного С-концевого участка, и необязательно хвостовую последовательность из 6X his.

II. Биологические свойства аднектинов к PD-L1

В данном документе представлены аднектины, которые связываются с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 10, 1, 0,5, 0,1 нМ или менее при определении, например, с помощью метода SPR (Biacore), и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

1) ингибирование взаимодействия между человеческим PD-L1 и человеческим PD-1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, с помощью проточной цитометрии, например, с применением человеческого белка PD-1Fc и положительных по человеческому PD-L1 клеток, таких как L2987 клетки;

2) ингибирование связывания человеческого CD80 (B7-1) с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

3) ингибирование связывания антитела к PD-L1 12A4 (описанного, например, в патенте США № 7943743) с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore) и

4) ингибирование пролиферации клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 0,1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-4.

В данном документе представлены аднектины, которые содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связываются с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 10, 1, 0,5, 0,1 нМ или менее при определении, например, с помощью SPR (Biacore), и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

1) ингибирование взаимодействия между человеческим PD-L1 и человеческим PD-1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, с помощью проточной цитометрии, например, с применением человеческого белка PD-1Fc и положительных по человеческому PD-L1 клеток, таких как L2987 клетки;

2) ингибирование связывания человеческого CD80 (B7-1) с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

3) ингибирование связывания антитела к PD-L1 12A4 с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore) и

4) ингибирование пролиферации клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 0,1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины к PD-L1 конкурируют (например, перекрестно конкурируют) за связывание с PD-L1 с конкретными аднектинами к PD-L1, описанными в данном документе. Такие конкурирующие аднектины могут быть идентифицированы на основании их способности к конкурентному ингибированию связывания с PD-L1 аднектинов, описанных в дан-

ном документе, в стандартных анализах связывания PD-L1. Например, можно применять стандартные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок PD-L1 иммобилизируют на планшете, один из аднектинов метят флуоресцентной меткой и оценивают способность немеченых аднектинов препятствовать связыванию меченого аднектина за счет конкуренции.

В соответствии с определенными вариантами осуществления ELISA в конкурентном формате можно проводить для определения того, связываются ли два аднектина к PD-L1 с перекрывающимися сайтами связывания аднектина на PD-L1. В одном формате аднектин № 1 наносят в виде покрытия на планшет, который затем блокируют и промывают. В этот планшет добавляют либо PD-L1 сам по себе, либо PD-L1, подвергнутый предварительному инкубированию с насыщающей концентрацией аднектина № 2. После подходящего периода инкубирования планшет промывают и метят поликлональным антителом к PD-L1, таким как биотинилированное поликлональное антитело к PD-L1, с последующим выявлением с использованием конъюгата стрептавидин-HRP и стандартных процедур проявления с использованием тетраметилбензидина. Если сигнал в виде OD (оптическая плотность) является одинаковым с предварительным инкубированием с аднектином № 2 или без него, то два аднектина связываются независимо друг от друга, и сайты связывания аднектина для них не перекрываются. Однако, если сигнал в виде OD для лунок, в которые помещали смеси PD-L1/аднектин № 2, ниже, чем для лунок, в которые помещали PD-L1 сам по себе, то подтверждается, что связывание аднектина № 2 блокирует связывание аднектина № 1 с PD-L1.

В качестве альтернативы, подобный эксперимент проводят с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR, например, BIAcore). Аднектин № 1 иммобилизируют на поверхности чипа для SPR с последующими впрыскиваниями либо PD-L1 самого по себе, либо PD-L1, подвергнутого предварительному инкубированию с насыщающими концентрациями аднектина № 2. Если сигнал от связывания для смесей PD-L1/аднектин № 2 является одинаковым или большим, чем сигнал для связывания PD-L1 самого по себе, то два аднектина связываются независимо друг от друга, и сайты связывания аднектина для них не перекрываются. Однако, если сигнал от связывания для смесей PD-L1/аднектин № 2 ниже, чем сигнал от связывания для PD-L1 самого по себе, то подтверждается, что связывание аднектина № 2 блокирует связывание аднектина № 1 с PD-L1. Особенностью этих экспериментов является применение насыщающих концентраций аднектина № 2. Если PD-L1 не насыщается аднектином № 2, то вышеуказанные выводы не соблюдаются. Подобные эксперименты можно применять для определения того, связываются ли любые два связывающихся с PD-L1 белка с перекрывающимися сайтами связывания аднектина.

Оба анализа, проиллюстрированных выше, можно проводить в обратном порядке, когда аднектин № 2 иммобилизируют, а PD-L1-аднектин № 1 добавляют в планшет. В качестве альтернативы, аднектин № 1 и/или № 2 могут быть заменены на моноклональное антитело и/или растворимый слитый белок рецептор-Fc.

В соответствии с определенными вариантами осуществления конкуренция может быть определена с использованием сендвич-анализа HTRF.

В соответствии с определенными вариантами осуществления конкурирующий аднектин представляет собой аднектин, который связывается с тем же сайтом связывания аднектина на PD-L1, что и конкретный аднектин к PD-L1, описанный в данном документе. Стандартные методики картирования, такие как картирование с использованием протеазы, мутационный анализ, HDX-MS, рентгеноструктурная кристаллография и 2-мерный ядерный магнитный резонанс, можно применять для определения того, связывается ли аднектин с тем же сайтом связывания аднектина или эпитопом, что и эталонный аднектин (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Эпитоп определяют с помощью способа, применяемого для определения его местоположения. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления PD-L1 аднектин или антитело связывается с тем же эпитопом, что и один из PD-L1 аднектинов, описанных в данном документе, при определении с помощью HDX-MS или при определении с помощью рентгеноструктурной кристаллографии.

Кандидатные конкурирующие аднектины к PD-L1 могут ингибировать связывание аднектинов к PD-L1, описанных в данном документе, с PD-L1 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%, и/или их связывание ингибируется аднектинами к PD-L1 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%. Конкуренция в % может быть определена с использованием способов, описанных выше.

В данном документе представлены аднектины, которые связываются с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 10, 1, 0,5, 0,1 нМ или менее при определении, например, с помощью метода SPR (Biacore), и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

1) ингибирование взаимодействия между человеческим PD-L1 и человеческим PD-1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, с помощью проточной цитометрии, например, с применением человеческого белка PD-1Fc и положительных по человеческому PD-L1 клеток, таких как L2987 клетки;

2) ингибирование связывания человеческого CD80 (B7-1) с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

3) ингибирование связывания антитела к PD-L1 12A4 с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

4) ингибирование пролиферации клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и

5) конкуренция с антителом к PD-L1, описанным в данном документе, за связывание с человеческим PD-L1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-5. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 0,1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-5.

В данном документе представлены аднектины, которые содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связываются с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 10, 1, 0,5, 0,1 нМ или менее при определении, например, с помощью SPR (Biacore), и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

1) ингибирование взаимодействия между человеческим PD-L1 и человеческим PD-1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, с помощью проточной цитометрии, например, с применением человеческого белка PD-1Fc и положительных по человеческому PD-L1 клеток, таких как L2987 клетки;

2) ингибирование связывания человеческого CD80 (B7-1) с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

3) ингибирование связывания антитела к PD-L1 12A4 с человеческим PD-L1 по меньшей мере на 50, 70, 80, 90% или более при определении, например, в анализе ELISA или с помощью SPR (Biacore);

4) ингибирование пролиферации клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и

5) конкуренция с антителом к PD-L1, описанным в данном документе, за связывание с человеческим PD-L1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-5. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аднектину к PD-L1, описанному в данном документе, или его части (например, BC, DE и FG петлям), связывается с человеческим PD-L1 с KD, составляющей 0,1 нМ или менее, и проявляет каждое из свойств 1-5.

III. Слитые молекулы, включающие в себя фармакокинетические фрагменты

В соответствии с определенными вариантами осуществления желательно, чтобы аднектины к PD-L1 имели короткий период полувыведения, например, при применении в диагностической визуализации.

В качестве альтернативы, например, для терапевтических целей, аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, дополнительно содержат фармакокинетический (ПК) фрагмент. Улучшенные фармакокинетические характеристики можно оценивать в соответствии с ощущаемой терапевтической потребностью. Часто желаемым является повышение биологической доступности и/или повышение времени между дозами, возможно, за счет повышения времени, в течение которого белок остается доступным в сыворотке после введения дозы. В некоторых случаях желательным является улучшение стабильности концентрации белка в сыворотке со временем (например, уменьшение различия в концентрации белка в сыворотке непосредственно после введения и непосредственно перед следующим введением). Аднектин к PD-L1 может быть прикреплен к фрагменту, который снижает 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 аднектином к PD-L1. Другие измеряемые показатели для улучшенных фармакокинетических характеристик могут включать в себя период полувыведения из сыворотки, который часто делится на альфа-фазу и бета-фазу. Одна из фаз или обе фазы могут быть значительно улучшены посредством присоединения соответствующего фрагмента. Например, ПК-фрагмент может повышать период полувыведения полипептида из сыворотки более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% или более по сравнению с Fn3 доменом самим по себе.

Фрагменты, которые замедляют выведение белка из крови, называемые в данном документе "ПК-фрагментами", включают в себя полиоксиполкиленовые фрагменты (например, полиэтиленгликоль), сахара (например, сиаловую кислоту) и хорошо переносимые белковые фрагменты (например, Fc и его фраг-

менты и варианты, трансферрин или сывороточный альбумин). Аднектин к PD-L1 также может быть слит с альбумином или фрагментом (частью) или вариантом альбумина, как описано в публикации заявки на патент США № 2007/0048282, или может быть слит с одним или несколькими аднектинами, связывающимися с сывороточным альбумином, как описано в данном документе.

Другие РК-фрагменты, которые могут быть применены в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя описанные в Kontermann et al., (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22:868-76), включенном в данный документ посредством ссылки. Такие РК-фрагменты включают в себя без ограничения слитые молекулы на основе человеческого сывороточного альбумина, конъюгаты на основе человеческого сывороточного альбумина, связывающие средства на основе человеческого сывороточного альбумина (например, аднектин PKE, AlbuDAb, ABD), слитые молекулы на основе XTEN, слитые молекулы на основе PAS (т.е. рекомбинантные миметики PEG на основе трех аминокислот: пролина, аланина и серина), конъюгаты на основе углеводов (например, гидроксипропилкрахмала (HES)), гликозилирующие средства, конъюгаты на основе полисиаловой кислоты и конъюгаты на основе жирных кислот.

Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящим изобретением предполагается аднектин к PD-L1, слитый с РК фрагментом, который представляет собой полимерный сахар. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления РК-фрагмент представляет собой полиэтиленгликолевый фрагмент или Fc-участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления РК-фрагмент представляет собой белок, связывающийся с сывороточным альбумином, такой как описанные в публикациях заявок на патент США № 2007/0178082 и № 2007/0269422. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления РК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления РК-фрагмент представляет собой трансферрин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления РК-фрагмент связан с аднектином к PD-L1 посредством полипептидного линкера. Иллюстративные полипептидные линкеры включают в себя полипептиды, имеющие 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 аминокислоты. Подходящие линкеры для присоединения Fn3 доменов представляют собой линкеры, которые обеспечивают фолдинг отдельных доменов независимо друг от друга, образуя трехмерную структуру, которая обеспечивает высокоаффинное связывание с молекулой-мишенью. Конкретные примеры подходящих линкеров включают в себя линкеры на основе глицина-серина, линкеры на основе глицина-пролина, линкеры на основе пролина-аланина, а также любые другие линкеры, описанные в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-пролина. Эти линкеры содержат глициновые и пролиновые остатки и могут иметь длину от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры таких линкеров включают в себя GPG, GPGPGPG (SEQ ID NO: 672) и GPGPGPGPGPG (SEQ ID NO: 673). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой линкер на основе пролина-аланина. Эти линкеры содержат пролиновые и аланиновые остатки и могут иметь длину от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 и от 6 до 18 аминокислот. Примеры таких линкеров включают в себя PAPAPA (SEQ ID NO: 674), PAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 675) и PAPAPAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 676). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. Эти линкеры содержат глициновые и сериновые остатки и могут иметь длину от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот. Примеры таких линкеров включают в себя GSGSGSGSGS ((GS)₅; SEQ ID NO: 662), GSGSGSGSGSGS ((GS)₆; SEQ ID NO: 663), GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS ((GS)₁₀; SEQ ID NO: 677), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGS ((G₄S)₄; SEQ ID NO: 678), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGS ((G₄S)₅; SEQ ID NO: 670), и GGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 671). В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления линкер совсем не содержит пар Asp-Lys (DK). Перечень подходящих линкеров представлен в табл. 3.

Оптимальную длину и аминокислотный состав линкера можно определить с помощью стандартного экспериментирования, принимая во внимание информацию, представленную в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связан, например, с аднектином к HSA, посредством полипептидного линкера, имеющего сайт для протеазы, по которому может происходить расщепление протеазой в крови или ткани-мишени. Такие варианты осуществления можно применять с целью высвобождения аднектина к PD-L1 для лучшей доставки или терапевтических свойств или для более эффективного получения.

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

Полиэтиленгликоль

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектин к PD-L1 содержит полиэтиленгликоль (PEG). PEG представляет собой хорошо известный водорастворимый полимер, который является коммерчески доступным или может быть получен с помощью полимеризации этиленгликоля с раскрытием кольца в соответствии со способами, хорошо известными в уровне техники (Sandier and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Термин "PEG" используется в широком смысле, охватывая любую молекулу полиэтиленгликоля вне зависимости от размера или модификации на конце PEG, и его можно представить с помощью формулы: X-O(CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂OH, где n равно

от 20 до 2300 и X представляет собой H или концевую модификацию, например C₁₋₄алкил. PEG может содержать дополнительные химические группы, которые необходимы для реакций связывания, которые являются результатом химического синтеза молекулы; или которые действуют в качестве спейсера для оптимального отдаления частей молекулы. Кроме того, такой PEG может состоять из одной или нескольких боковых цепей PEG, которые связаны вместе. PEG с более чем одной цепью PEG называются PEG с несколькими цепями или разветвленными PEG. Разветвленные PEG описаны, например, в опубликованной заявке на европейский патент № 473084A и в патенте США № 5932462.

Одна или несколько молекул PEG могут быть прикреплены в разных положениях на белке, и такое прикрепление может быть достигнуто за счет реакции с аминами, тиолами или другими подходящими реакционноспособными группами. Аминный фрагмент может представлять собой, например, первичный амин, находящийся на N-конце полипептида, или аминокислотную группу, присутствующую в аминокислоте, такой как лизин или аргинин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PEG-фрагмент прикреплен в положении на полипептиде, выбранном из группы, состоящей из: а) N-конца; б) между N-концом и большей частью N-концевой бета-нити или бета-подобной нити; в) петли, расположенной на внешней поверхности полипептида напротив сайта связывания мишени; d) между C-концом и большей частью C-концевой бета-нити или бета-подобной нити и е) на C-конце.

Пегилирование можно осуществлять посредством сайт-специфического пегилирования, при котором в белок вводят подходящую реакционноспособную группу для создания сайта, по которому преимущественно происходит пегилирование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок модифицируют, вводя цистеиновый остаток в желаемое положение, что обеспечивает сайт-направленное пегилирование по цистеину. Для получения цистеиновых остатков в кодирующую последовательность белка могут быть введены мутации. Это может достигаться, например, посредством мутирования одного или нескольких аминокислотных остатков в цистеин. Предпочтительные аминокислоты для мутирования в цистеиновый остаток включают в себя серию, треонин, аланин и другие гидрофильные остатки. Предпочтительно, остаток, подлежащий мутированию в цистеин, представляет собой обращенный к поверхности остаток. В уровне техники хорошо известны алгоритмы для прогнозирования доступности остатков на поверхности, исходя из первичной структуры последовательности белка. В качестве альтернативы, поверхностные остатки можно спрогнозировать посредством сравнения аминокислотных последовательностей связывающих полипептидов при условии того, что кристаллическая структура каркаса, на основе которого сконструированы и созданы связывающие полипептиды, была расшифрована (см. Himanen et al., *Nature* 2001; 414:933-8), и благодаря этому можно идентифицировать обращенные к поверхности остатки. Пегилирование цистеиновых остатков можно выполнять с применением, например, PEG-малеимида, PEG-винилсульфона, PEG-йодацетамида или PEG-ортопиридилдисульфида. В соответствии с определенными вариантами осуществления PEG связан с C-концевым цистеином, например, цистеином, который был добавлен к аднектину к PD-L1, как например, в виде "PC" продолжения, как дополнительно описано в данном документе.

PEG, как правило, активируется подходящей активирующей группой, подходящей для связывания с желаемым сайтом на полипептиде. Способы пегилирования являются хорошо известными в уровне техники и дополнительно описываются в Zalipsky S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" в *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, Plenum Press, New York (1992); и в Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16: 157-182.

Молекулярная масса PEG может варьировать в широких пределах, и он может быть разветвленным или линейным. Как правило, средневесовая молекулярная масса PEG составляет от приблизительно 100 до приблизительно 150000 Да. Иллюстративные значения средневесовой молекулярной массы для PEG включают в себя приблизительно 5000 Да, приблизительно 10000 Да, приблизительно 20000 Да, приблизительно 40000 Да, приблизительно 60000 Да и приблизительно 80000 Да. В соответствии с определенными вариантами осуществления молекулярная масса PEG составляет 40000 Да. Также можно применять разветвленные варианты PEG, имеющие суммарную молекулярную массу, соответствующую любой из вышеизложенных. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PEG имеет две ветви. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PEG имеет четыре ветви. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления PEG представляет собой бис-PEG (NOF Corporation, DE-200MA), в котором конъюгированы два аднектина (см., например, пример 1 и ATI-1341 из табл. 5).

Традиционные методики разделения и очистки, известные в уровне техники, можно применять для очистки пегилированных аднектинов к PD-L1, как например, гель-хроматографию (например, гелефильтрацию) и ионообменную хроматографию. Продукты также можно разделять с применением SDS-PAGE. Продукты, которые могут быть разделены, включают в себя моно-, ди-, три-, поли- и непегилированные аднектины, а также несвязанный PEG. Процент моно-PEG конъюгатов можно контролировать, собирая более широкие фракции вокруг элюируемого пика для повышения процента моно-PEG в композиции. Значение приблизительно 90% моно-PEG конъюгатов представляет собой хорошее соотношение выхода и активности.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пегилированные аднектины к PD-L1 предпочтительно будут сохранять по меньшей мере приблизительно 25, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или

100% биологической активности, ассоциированной с немодифицированным аднектином к PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологическая активность относится к его способности к связыванию с PD-L1, которую оценивают по K_D , k_{on} или k_{off} . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у пегилированного аднектина к PD-L1 проявляется повышение связывания с PD-L1 по сравнению с непегилированным аднектином к PD-L1.

Fc-домен (и фрагменты) иммуноглобулина

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 слит с Fc-доменом иммуноглобулина или его фрагментом или вариантом. В контексте данного документа "функциональный Fc-участок" представляет собой Fc-домен или его фрагмент, который сохраняет способность к связыванию с FcRn. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функциональный Fc-участок связывается с FcRn, но не обладает эффекторной функцией. Способность Fc-участка или его фрагмента к связыванию с FcRn можно определить с помощью стандартных анализов связывания, известных в уровне техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-участок или его фрагмент связывается с FcRn и обладает по меньшей мере одной "эффекторной функцией" нативного Fc-участка. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание Clq; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; уменьшение количества рецепторов на клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Для таких эффекторных функций обычно требуется сочетание Fc-участка со связывающим доменом (например, аднектина к PD-L1), и их можно оценить с применением различных анализов, известных в уровне техники для оценки таких эффекторных функций антитела.

"Fc-участок с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруживаемого в природе. "Вариант Fc-участка" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от Fc-участка с нативной последовательностью вследствие модификации по меньшей мере одной аминокислоты. Предпочтительно вариант Fc-участка имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в сравнении с последовательностью Fc-участка или с Fc-участком исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-участке с нативной последовательностью или в Fc-участке исходного полипептида. Вариант Fc-участка в контексте данного документа предпочтительно будет обладать последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной Fc-участку с нативной последовательностью и/или Fc-участку исходного полипептида, и наиболее предпочтительно последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной им, более предпочтительно, последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной им.

В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления Fc-домен получен из подкласса IgG1, тем не менее, также можно применять другие подклассы (например, IgG2, IgG3 и IgG4). Ниже показана последовательность Fc-домена человеческого иммуноглобулина IgG1:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 620)

Коровая последовательность шарнирного участка выделена подчеркиванием, и CH2 и CH3 участки представлены обычным текстом. Следует понимать, что С-концевой лизин является необязательным. Также можно применять аллотипы и мутанты этой последовательности. Как известно в уровне техники, мутанты могут быть предназначены для модуляции ряда свойств Fc, например, ADCC, CDC или периода полувыведения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления Fc-участок, применяемый в слитом белке на основе аднектина к PD-L1, содержит CH1 участок. В соответствии с определенными вариантами осуществления Fc-участок, применяемый в слитом белке на основе аднектина к PD-L1, содержит CH2 и CH3 участки. В соответствии с определенными вариантами осуществления Fc-участок, применяемый в слитом белке на основе аднектина к PD-L1, содержит CH2, CH3 и шарнирный участок (например, приведенный в SEQ ID NO: 620).

В соответствии с определенными вариантами осуществления "шарнирный" участок содержит коровые шарнирные остатки, охватывающие положения 1-16 в SEQ ID NO: 620 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 621) Fc-участка IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления слитая молекула из аднектина к PD-L1 и Fc принимает мультимерную структуру (например, димерную), отчасти, благодаря цистеиновым остаткам в положениях 6 и 9 в SEQ ID NO: 620 в пределах шарнирного участка. Другие подходящие иллюстративные шарнирные участки изложены в SEQ ID NO: 622-626.

Аднектины

В соответствии с определенными вариантами осуществления РК-фрагмент представляет собой другой аднектин, специфичный, например, в отношении сывороточного белка (например, человеческого

сывороточного альбумина), как описано в заявке на патент США № 2012/0094909, включенной в данный документ посредством ссылки в своей полноте. Другие РК-фрагменты, которые можно применять с аднектинами, описанными в данном документе, описаны в Kontermann et al. (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22:868-76), как обсуждалось выше.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектин к PD-L1 может быть непосредственно или опосредованно связан, например, с аднектином к HSA, посредством полимерного линкера. Полимерные линкеры можно применять для того, чтобы оптимальным образом варьировать расстояние между каждым компонентом слитой молекулы для создания слитого белка с одной или несколькими из следующих характеристик: 1) уменьшенное или увеличенное стерическое затруднение связывания одного или нескольких доменов белка при связывании с белком, представляющим интерес, 2) повышенная стабильность или растворимость белка, 3) пониженная агрегация белка и 4) повышенная общая авидность или аффинность белка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектин к PD-L1 связан, например, с аднектином к HSA, посредством биосовместимого полимера, такого как полимерный сахар. Полимерный сахар может включать в себя сайт для ферментативного расщепления, по которому может происходить расщепление ферментом в крови или ткани-мишени. Такие варианты осуществления можно применять с целью высвобождения аднектина к PD-L1 для лучшей доставки или терапевтических свойств или более эффективного получения.

IV. Технология получения слитых молекул из нуклеиновой кислоты и белка

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предполагается аднектин, содержащий фибронектиновые домены III типа, который связывается с PD-L1. Одним способом для быстрого получения и тестирования Fn3 доменов со свойствами специфичного связывания является технология получения слитых молекул из нуклеиновой кислоты и белка от Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company. В настоящем раскрытии используется технология *in vitro* экспрессии и маркирования, называемая 'PRO-fusion', в которой используются слитые молекулы из нуклеиновой кислоты и белка (слитые молекулы из РНК и белка и слитые молекулы из ДНК и белка) для идентификации новых полипептидов и аминокислотных мотивов, которые являются важными для связывания с белками. Технология получения слитых молекул из нуклеиновой кислоты и белка представляет собой технологию, с помощью которой ковалентно связывают белок с кодирующей его генетической информацией. Для подробного описания технологии получения слитых молекул из РНК и белка и способов скрининга библиотек каркасных белков на основе фибронектина, см. Szostak et al., патенты США №№ 6258558, 6261804, 6214553, 6281344, 6207446, 6518018 и 6818418; 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 данный документ посредством ссылки.

V. Векторы и полинуклеотиды

В настоящее раскрытие также включены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие любые из белков, описанных в данном документе. Как понятно специалисту в данной области техники, вследствие вырожденности третьего основания, почти каждая аминокислота может быть представлена более чем одним триплетным кодоном в кодирующей нуклеотидной последовательности. Кроме того, незначительные изменения пар оснований могут приводить в результате к консервативной замене в кодируемой аминокислотной последовательности, но не ожидается, что они значительно изменяют биологическую активность продукта гена. Таким образом, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, описанный в данном документе, может быть подвергнута незначительной модификации последовательности и при этом все равно кодировать свой соответствующий продукт гена. Определенные иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие аднектины к PD-L1 и слитые молекулы на их основе, описанные в данном документе, включают в себя нуклеиновые кислоты, имеющие последовательности, которые изложены в SEQ ID NO: 16-19, 31-34, 46-49, 61-64, 76-79, 92-95 и 108-111.

Также предполагаются последовательности нуклеиновой кислоты, которые являются по меньшей мере на 50%, как например, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 16-19, 31-34, 46-49, 61-64, 76-79, 92-95 и 108-111 и кодируют белок, который связывается с PD-L1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидные замены вводят таким образом, чтобы не изменять получаемую в результате транслируемую аминокислотную последовательность.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из различных белков или полипептидов, описанных в данном документе, могут быть химически синтезированными. Частота использования кодона может быть выбрана таким образом, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такая частота использования кодона будет зависеть от выбранного типа клеток. Специализированные схемы частоты использования кодона были разработаны для *E. coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, растительных клеток, клеток дрожжей и клеток насекомых. См., например: Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2): 438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1): 96-105 (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 методики для манипуляции с нуклеиновой кислотой 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 дополнениях, включенных в данный документ посредством ссылки. Обычно ДНК, кодирующая полипептид, является функционально связанной с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, полученными из генов млекопитающего, вируса или насекомого. Такие регуляторные элементы включают в себя транскрипционный промотор, необязательную операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий сайт связывания рибосом на мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Дополнительно предполагается способность к репликации у хозяина, обычно придаваемая точкой начала репликации, и ген для селекции, облегчающий распознавание трансформантов.

Белки, описанные в данном документе, могут быть получены с помощью рекомбинантных методик не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий сайт для специфического расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и подвергается процессингу (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Иллюстративная N-концевая лидерная последовательность для получения полипептидов в системе на основе млекопитающего представляет собой

METDTLLLWVLLLVPGSTG (SEQ ID NO: 583)

которая удаляется клеткой-хозяином после экспрессии.

В случае прокариотических клеток-хозяев, в которых не распознается и не подвергается процессингу нативная сигнальная последовательность, сигнальная последовательность заменена на прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, 1 рр или термостабильного энтеротоксина II.

В случае секреции дрожжами нативную сигнальную последовательность можно заменить, например, на лидерную последовательность инвертазы дрожжей, лидерную последовательность фактора (в том числе лидерные последовательности альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*), или лидерную последовательность кислой фосфатазы, лидерную последовательность глюкоамилазы *C. albicans*, или сигнальную последовательность, описанную в патенте США № 5631144. При экспрессии в клетке млекопитающего доступны сигнальные последовательности млекопитающего, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса. ДНК для таких участков-предшественников может быть лигирована в рамку считывания к ДНК, кодирующей белок.

Как векторы экспрессии, так и векторы клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Обычно в векторах клонирования эта последовательность представляет собой последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает в себя точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности являются хорошо известными для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 является подходящей для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации из 2-микронной плазмиды является подходящей для дрожжей, и точки начала репликации из различных вирусов (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) являются подходящими для векторов клонирования в клетках млекопитающих. Обычно компонент точки начала репликации не является необходимым для векторов экспрессии у млекопитающих (точка начала репликации SV40, как правило, может применяться только потому, что она содержит ранний промотор).

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген для селекции, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены для селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или трайцилину, (б) дополняют недостаточности ауксотрофных организмов или (с) обеспечивают критически важные питательные вещества, которые не доступны из сложных сред, например ген, кодирующий Д-аланинрацемазу для бацилл.

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и является функционально связанным с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок, описанный в данном документе, например каркасный белок на основе фибронектина. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор *rhoA*, бета-лактамазную и лактозную промоторные системы, промотор гена щелочной фосфатазы, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как промотор *tan*. Тем не менее, подходящими являются другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связан-

ную с ДНК, кодирующей белок, описанный в данном документе. Также известны промоторные последовательности для эукариот. Практически все эукариотические гены имеют АТ-богатый участок, расположенный примерно на 25-30 оснований выше сайта, где происходит инициация транскрипции. Другой последовательностью, находящейся на 70-80 оснований выше точки старта транскрипции у многих генов, является CNCAAT участок, в котором N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления хвостовой последовательности из полиА к 3'-концу кодирующей последовательности. Все из этих последовательностей подходящим образом вводят в векторы экспрессии у эукариот.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения с дрожжевыми клетками-хозяевами включают в себя промоторы для гена 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируват-декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозаизомераза и глюкокиназа.

Транскрипция с векторов в клетках-хозяевах млекопитающего может контролироваться, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как полиомавирус, вирус куриной оспы, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотора гена актина или промотора гена иммуноглобулина, из промоторов генов белков теплового шока при условии, что такие промоторы являются совместимыми с системами клетки-хозяина.

Транскрипция ДНК, кодирующей белок, описанный в данном документе, высшими эукариотами часто повышается при введении в вектор энхансерной последовательности. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, будет применяться энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают в себя энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомавируса на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982), в отношении энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть внедрен в вектор в положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей пептид, но предпочтительно он расположен на 5' сайте относительно промотора.

Векторы экспрессии, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядерных клеток из других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминирования транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности являются общедоступными из 5', и иногда 3', не-транслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибирующиеся в виде полиаденилированных фрагментов в не-транслируемой части мРНК, кодирующей белок, описанный в данном документе. Один пригодный компонент для терминирования транскрипции представляет собой участок полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. международную заявку WO 94/11026 и вектор экспрессии, раскрытый в ней.

Рекомбинантная ДНК также может включать в себя любой тип последовательности метки для белка, которая может быть пригодной для очистки белка. Примеры меток для белка включают в себя без ограничения гистициновую метку, FLAG-метку, тус-метку, HA-метку или GST-метку. Соответствующие векторы клонирования и экспрессии для применения с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами из млекопитающего могут быть найдены в Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York (1985)), соответствующее раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

Экспрессионный конструктор вводят в клетку-хозяина с применением способа, подходящего для клетки-хозяина, как будет понятно специалисту в данной области техники. Ряд способов введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева известен в уровне техники, в том числе без ограничения электропорация; трансфекция с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировка микрочастицами; липофекция и инфекция (в случае, когда вектор представляет собой инфекционный агент).

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 виды из рода *Saccharomyces*, как например, *S. cerevisiae*, также можно применять для продуцирования полипептидов. Различные системы на основе культуры клеток млекопитающих или насекомых также можно применять для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для продуцирования гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются в Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Примеры подходящих линий клеток-хозяев из млекопитающего включают в себя эндотелиальные клетки, линию клеток почки обезьяны COS-7, CV-1, L клетки, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки

эмбриональной почки человека, клеточные клетки HeLa, 293, 293T и ВНК. Очищенные полипептиды получают путем культивирования в подходящих системах хозяин/вектор для экспрессии рекомбинантных белков. Для многих применений небольшой размер многих из полипептидов, описанных в данном документе, будет делать экспрессию в *E. coli* предпочтительным способом для экспрессии. Белок затем очищают от среды культивирования или клеточных экстрактов.

VI. Получение белка

В данном документе также описаны клеточные линии, которые экспрессируют аднектин к PD-L1 или слитый полипептид на основе него. Получение и выделение клеточных линий, продуцирующих аднектин к PD-L1, может быть выполнено с применением стандартных методик, известных в уровне техники, таких как описанные в данном документе.

Клетки-хозяева трансформируют описанными в данном документе векторами экспрессии или клонирования для получения белка и культивируют в традиционной питательной среде, модифицированной соответствующим образом для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Аднектины согласно настоящему изобретению также могут быть получены в агликозилированной форме посредством продуцирования аднектинов, например, в прокариотических клетках (например, *E. coli*). Примечательно, что агликозилированные формы аднектинов, описанных в данном документе, проявляют такую же аффинность, эффективность и механизм действия, что и гликозилированные аднектины при исследовании *in vitro*.

Клетки-хозяева, применяемые для продуцирования белков в соответствии с настоящим изобретением, можно культивировать в ряде сред. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma), являются подходящими для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, многие из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), в патентах США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655, 5122469, 6048728, 5672502 или патентном документе США № RE 30985, могут быть применены в качестве сред культивирования для клеток-хозяев. Любые из этих сред могут быть дополнены, если необходимо, гормонами и/или другими ростовыми факторами (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, соли кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство на основе гентамицина), следовыми элементами (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 будут известны специалисту в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидными специалисту в данной области техники.

Белки, описанные в данном документе, также можно получать с применением бесклеточных трансляционных систем. Для таких целей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, нужно модифицировать, чтобы обеспечить возможность транскрипции *in vitro* для продуцирования мРНК и для обеспечения бесклеточной трансляции мРНК в конкретной бесклеточной системе, которая используется (эукариотическая бесклеточная трансляционная система, как например, на основе млекопитающего или дрожжей, или прокариотическая бесклеточная трансляционная система, как например, на основе бактерий).

Белки, описанные в данном документе, также можно получать с помощью химического синтеза (например, с помощью способов, описанных в Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Модификации в белке также можно получать с помощью химического синтеза.

Белки согласно настоящему изобретению могут быть очищены с помощью способов выделения/очистки белков, обычно известных в области химии белков. Неограничивающие примеры включают в себя экстрагирование, перекристаллизацию, высаливание (например, с использованием сульфата аммония или сульфата натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, гель-фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, афинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки полипептиды можно подвергнуть замене буфера с использованием разных буферов и/или можно концентрировать с помощью любого из ряда способов, известных в уровне техники, в том числе без ограничения фильтрации и диализа.

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

Получение белка способом с высокой пропускной способностью (HTPP)

Выбранные связывающие молекулы клонируют в вектор PET9d выше НК₆-метки, трансформируют

в BL21 DE3 plysS клетки *E.coli* и инокулируют в 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина в 24-луночном формате, и выращивают при 37°C в течение ночи. Культуры в 5 мл свежей среды LB (50 мкг/мл канамицина) получают для индуцируемой экспрессии посредством аспирации 200 мкл из культуры, которая выращивалась в течение ночи, и помещения их в соответствующую лунку. Культуры выращивают при 37°C до достижения значения A_{600} 0,6-0,9. После индукции с использованием 1 mM изопропил- β -тиогалактозида (IPTG) обеспечивают экспрессию в культуре в течение 6 ч при 30°C и собирают клетки посредством центрифугирования в течение 10 мин при 2750 g при 4°C.

Клеточные осадки (в 24-луночном формате) лизируют посредством ресуспендирования в 450 мкл лизирующего буфера (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 1x Complete™ Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (полный коктейль ингибиторов протеазы, не содержащий EDTA) (Roche), 1 mM PMSF, 10 mM CHAPS, 40 mM имидазол, 1 мг/мл лизоцим, 30 мкг/мл ДНКазы, 2 мкг/мл апротонина, pH 8,0) и встряхивают при комнатной температуре в течение 1-3 ч. Лизаты очищают и повторно сцеживают в 96-луночном формате посредством переноса в 96-луночный фильтровальный планшет Whatman GF/D Unifilter, оснащенный 96-луночным планшетом для улавливания объемом 1,2 мл и фильтруют под положительным давлением. Очищенные лизаты переносят в 96-луночный планшет с хелатообразующим покрытием на основе никеля или кобальта, которое было уравновешено с использованием выравнивающего буфера (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 40 mM имидазол, pH 8,0), и инкубируют в течение 5 мин. Несвязавшийся материал удаляют под положительным давлением. Смола промывают дважды промывочным буфером № 1 (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 5 mM CHAPS, 40 mM имидазол, pH 8,0) в количестве 0,3 мл/лунку. При каждой промывке промывочный буфер удаляют с помощью положительного давления. Перед элюированием каждую лунку промывают 50 мкл элюирующего буфера (PBS + 20 mM EDTA), инкубируют в течение 5 мин и при этом промывании буфер удаляют под положительным давлением. Белок элюируют посредством внесения дополнительных 100 мкл элюирующего буфера в каждую лунку. После 30-минутного инкубирования при комнатной температуре планшет(планшеты) центрифугируют в течение 5 мин при 200 g и элюированный белок собирают в 96-луночные планшеты для улавливания, содержащие 5 мкл 0,5 M MgCl_2 , добавленного на дно планшета для улавливания элюированного материала перед элюированием. Элюированный белок количественно определяют с помощью анализа общего белка с использованием $^{10}\text{Fn3}$ домена дикого типа в качестве белка-стандарта.

Экспрессия и очистка нерастворимых связывающих молекул на основе фибронектиновых каркасных белков в среднем масштабе

Для экспрессии нерастворимых клонов клон(клоны) с присоединенной к концу His_6 -меткой клонируют в вектор pET9d (EMD Bioscience, Сан-Диего, Калифорния) и экспрессируют в HMS174 клетках *E. coli*. Двадцать мл инокулирующей культуры (полученной из одной посеянной колонии) используют для инокуляции 1 л среды LB, содержащей 50 мкг/мл карбенициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуру выращивают при 37°C до достижения значения A_{600} 0,6-1,0. После индукции с использованием 1 mM изопропил- β -тиогалактозида (IPTG) культуру выращивают в течение 4 ч при 30°C и собирают с помощью центрифугирования в течение 30 мин при > 10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживают до -80°C. Клеточный осадок ресуспендируют в 25 мл лизирующего буфера (20 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (Roche), 1 mM PMSF, pH 7,4) с использованием гомогенизатора ULTRA-TURRAX® (IKA works) на льду. Лизис клеток достигается за счет гомогенизации при высоком давлении (>18000 фунтов/кв. дюйм) с использованием гомогенизатора MICROFLUIDIZER® модели M-1 10S (Microfluidics). Нерастворимую фракцию отделяют посредством центрифугирования в течение 30 мин при 23300 g при 4°C. Нерастворимый осадок, извлеченный в результате центрифугирования лизата, промывают буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl, pH 7,4. Осадок повторно солюбилизируют в 6,0 M гуанидин-гидрохлориде в буфере на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl, pH 7,4, с использованием ультразвуковой обработки с последующим инкубированием при 37° в течение 1-2 ч. Повторно солюбилизированный осадок фильтруют через фильтр с размером ячеек 0,45 мкм и загружают на Histrap колонку, уравновешенную буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl/6,0 M гуанидина, pH 7,4. После загрузки колонку промывают тем же буфером в объеме, соответствующем дополнительным 25 CV (объем колонки). Связавшийся белок элюируют 50 mM имидазолом в буфере на основе 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl/6,0 M гуанидин-HCl, pH 7,4. Очищенный белок подвергают рефолдингу посредством диализа против буфера на основе 50 mM ацетата натрия/150 mM NaCl, pH 4,5.

Экспрессия и очистка растворимых связывающих молекул на основе фибронектиновых каркасных белков в среднем масштабе

Для экспрессии растворимых клонов клон(клоны) с присоединенной к концу His_6 -меткой клонируют в вектор pET9d (EMD Bioscience, Сан-Диего, Калифорния) и экспрессируют в HMS174 клетках *E. coli*. 20 мл инокулирующей культуры (полученной из одной посеянной колонии) используют для инокуляции 1 л среды LB, содержащей 50 мкг/мл карбенициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуру выращивают при 37°C до достижения значения A_{600} 0,6-1,0. После индукции с использованием 1 mM изопропил- β -тиогалактозида (IPTG) культуру выращивают в течение 4 ч при 30°C и собирают с помощью

центрифугирования в течение 30 мин при $>10000g$ при $4^{\circ}C$. Клеточные осадки замораживают до $-80^{\circ}C$. Клеточный осадок ресуспендируют в 25 мл лизирующего буфера (20 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 1× Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free (Roche), 1 mM PMSF, pH 7,4) с использованием гомогенизатора ULTRA-TURRAX® (IKA works) на льду. Лизис клеток достигается за счет гомогенизации при высоком давлении (>18000 фунтов/кв. дюйм) с использованием гомогенизатора MICROFLUTDIZER® модели M-110S (Microfluidics). Растворимую фракцию отделяют посредством центрифугирования в течение 30 мин при $23300g$ при $4^{\circ}C$. Супернатант очищают посредством фильтрования через фильтр с размером ячеек 0,45 мкм. Очищенный лизат загружают на Histrap колонку (GE), предварительно уравновешенную буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl, pH 7,4. Колонку затем промывают тем же буфером в объеме, соответствующем 25 объемам колонки, за этим следует промывание буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl/ 25 mM имидазола, pH 7,4, в объеме, соответствующем 20 объемам колонки, а затем промывание буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl/40 mM имидазола, pH 7,4, в объеме, соответствующем 35 объемам колонки. Белок элюируют буфером на основе 20 mM фосфата натрия/500 M NaCl/500 mM имидазола, pH 7,4, в объеме, соответствующем 15 объемам колонки, фракции объединяют на основании оптического поглощения при A_{280} и осуществляют их диализ против IXPBS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,5, или 50 mM NaOAc; 150 mM NaCl; pH 4,5. Любой осадок удаляют посредством фильтрования через фильтр с размером ячеек 0,22 мкм.

VII. Композиции

Настоящим изобретением дополнительно предусматриваются композиции, такие как фармацевтические композиции и радиофармацевтические композиции, содержащие аднектин к PD-L1 или слитые белки на его основе, описанные в данном документе, причем композиция, по существу, не содержит эндотоксинов или содержит по меньшей мере не более чем приемлемые уровни эндотоксинов, которые определены соответствующим регуляторным органом (например, FDA).

Композиции согласно настоящему изобретению могут иметь форму пилюли, таблетки, капсулы, жидкости или таблетки с пролонгированным высвобождением для перорального введения; жидкости для внутривенного, подкожного или парентерального введения; или геля, лосьона, мази, крема или полимера или другой среды для пролонгированного высвобождения для местного введения.

Широко известные способы получения композиций приведены, 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 содержать, например, вспомогательные вещества, стерильную воду, солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталины. Биологически совместимый, биологически разлагаемый полимер лактида, сополимер лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена можно применять для контроля высвобождения соединений. Композиции наночастиц (например, биоразлагаемых наночастиц, твердых липидных наночастиц, липосом) можно применять для контроля биологического распределения соединений. Другие потенциально пригодные системы для парентеральной доставки включают в себя частицы сополимеров этилена-винилацетата, осмотические наносы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в композиции варьирует в зависимости от ряда факторов, в том числе дозы лекарственного средства, которую следует ввести, пути введения и назначения композиции (например, профилактического, терапевтического, диагностического).

Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными по отношению к реципиентам в используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный буфер и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензилламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил-или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (имеющие 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, в том числе глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Полипептиды согласно настоящему изобретению необязательно можно вводить в виде фармацевтически приемлемой соли, такой как нетоксичные соли присоединения присоединения кислоты или комплексы с металлами, которые обычно применяются в фармацевтической промышленности. Примеры солей присоединения кислоты включают в себя органические кислоты, такие как уксусная, молочная, памовая, малеиновая, лимонная, яблочная, аскорбиновая, янтарная, бензойная, пальмитиновая, субериновая, салициловая, винная, метансульфоновая, толуолсульфоновая или трифторуксусная кислоты или

т.п.; полимерные кислоты, такие как дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлозу или подобное; и неорганическую кислоту, такую как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота или подобное. Комплексы металлов включают в себя цинк, железо и т.п. В одном примере полипептид составляют в присутствии с ацетата натрия для повышения термостабильности.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулу, полученную, например, посредством методик коацервации или посредством полимеризации на границе раздела фаз, например, микрокапсулу из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулу из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы для доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты с пролонгированным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с пролонгированным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие белки, которые описаны в данном документе, причем указанные матрицы присутствуют в виде сформованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с пролонгированным высвобождением включают в себя сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемые сополимеры этилена-винилацетата, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DE-ROT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Несмотря на то что полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, обеспечивают возможность высвобождения молекул в течение более чем 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Хотя инкапсулированные белки, описанные в данном документе, могут оставаться в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит в результате к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии стабилизации в зависимости от задействованного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации основывается на образовании межмолекулярных S-S связей посредством тиол-дисульфидного обмена, стабилизация может быть достигнута посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислотных растворов, контроля содержания влаги, применения соответствующих добавок и разработки конкретных композиций полимерной матрицы.

Композиции согласно настоящему изобретению для перорального применения включают в себя таблетки, содержащие активный ингредиент(ингредиенты) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу и сорбит), смазывающие средства, средства, способствующие скольжению, и средства, препятствующие адгезии (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, формы диоксида кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк). Композиции для перорального применения также могут обеспечиваться в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой.

Фармацевтическая композиция, которая должна применяться для введения *in vivo*, как правило, должна быть стерильной. Это может быть достигнуто за счет фильтрования через стерильные мембранные фильтры. В случае, когда композиция является лиофилизированной, стерилизацию с помощью этого способа можно проводить либо перед или после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например, мешок или пузырек для внутривенного раствора, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию иглой для подкожной инъекции.

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

Композиции, описываемые в данном документе, также могут содержать более чем одно активное соединение, которое необходимо для лечения при конкретном показании, предпочтительно, активные соединения с дополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

VIII. Биофизическая и биохимическая характеристика

Связывание аднектина к PD-L1, описанного в данном документе, с PD-L1 можно оценить на осно-

вании констант равновесия (например, диссоциации, K_D) и на основании констант скорости реакции (например, константа скорости ассоциации, k_{on} , и константа скорости диссоциации, k_{off}). Аднектин обычно будет связываться с молекулой-мишенью с K_D , составляющей менее 500 нМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 200 пМ или 100 пМ, хотя более высокие значения K_D могут допускаться в тех случаях, когда k_{off} является достаточно низкой, или k_{on} является достаточно высокой.

In vitro анализы аффинности связывания

Аднектин к PD-L1, который связывается с PD-L1 и проявляет антагонизм в отношении PD-L1, можно идентифицировать с применением различных *in vitro* анализов. В соответствии с определенными вариантами осуществления анализы представляют собой анализы с высокой пропускной способностью, которые обеспечивают возможность одновременного скрининга нескольких кандидатных аднектинов.

Иллюстративные анализы для определения аффинности связывания у аднектина к PD-L1 включают в себя без ограничения методы, осуществляемые в жидкой фазе, такие как анализ кинетики исключения (KinExA) (Blake et al., JBC 1996; 271:27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328:35-43), анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы Biacore (Уппсала, Швеция) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton and Myszk, 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).

В соответствии с определенными вариантами осуществления биомолекулярные взаимодействия можно отслеживать в реальном масштабе времени с использованием системы Biacore, в которой SPR используется для выявления изменений резонанса при угле падения света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной подложке, обусловленных изменениями показателя преломления у поверхности на расстоянии до 300 нМ. В анализе Biacore получают константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, равновесные константы диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают посредством оценки констант скорости ассоциации и диссоциации с использованием системы Biacore для измерения поверхностного плазмонного резонанса (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируют для ковалентного связывания с мишенью. Мишень затем разводят и впрыскивают на чип с получением сигнала в виде единиц ответа для иммобилизованного материала. Поскольку сигнал в резонансных единицах (RU) является пропорциональным массе иммобилизованного материала, он представляет диапазон плотностей иммобилизованной мишени на матрице. Данные ассоциации и диссоциации одновременно приводят в соответствие в глобальном анализе для получения выражения результирующего показателя для биомолекулярного взаимодействия в соотношении 1:1, с получением в результате наиболее согласующихся величин для k_{on} , k_{off} и R_{max} (максимальный ответ при насыщении). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_D , рассчитывают на основании измерений SPR в виде соотношения k_{off}/k_{on} .

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, проявляют K_D в анализе аффинности с помощью SPR, описанном в примере 2, составляющую 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.

Следует понимать, что анализы описанные выше в данном документе, являются иллюстративными, и что любой способ, известный в уровне техники для определения аффинности связывания между белками (например, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), твердофазный иммуоферментный анализ и конкурентные анализы связывания (например, радиоиммунологические анализы)) можно применять для оценки аффинностей связывания аднектинов к PD-L1, описанных в данном документе.

IX. In vivo визуализация с использованием аднектинов к PD-L1

Визуализирующие средства

Аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, также являются полезными в ряде диагностических и визуализационных применений. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 является меченым фрагментом, который может быть выявлен *in vivo*, и такие меченые аднектины можно применять в качестве визуализирующих средств *in vivo*, например для визуализации всего организма. Например, в соответствии с одним вариантом осуществления способ выявления положительной по PD-L1 опухоли у субъекта предусматривает введение субъекту аднектина к PD-L1, связанного с выявляемой меткой, и выявление метки у субъекта спустя соответствующий период времени.

Визуализирующее средство на основе аднектина к PD-L1 можно применять для диагностики нарушения или заболевания, ассоциированного с повышенными уровнями PD-L1, например, злокачественной опухоли, причем опухоль селективно сверхэкспрессирует PD-L1. Аналогичным образом, аднектин к PD-L1 можно применять для мониторинга уровней PD-L1 у субъекта, например субъекта, который получает лечение для снижения уровней PD-L1 и/или количества положительных по PD-L1 клеток (например, опухолевых клеток). Аднектины к PD-L1 можно применять с модификацией или без нее, и их можно метить посредством ковалентного или нековалентного прикрепления выявляемого фрагмента.

Выявляемые фрагменты, которые можно применять, включают в себя радиоактивные средства, та-

кие как радиоактивные тяжелые металлы, такие как хелатные комплексы железа, радиоактивные хелатные комплексы гадолиния или марганца, излучатели позитронов из кислорода, азот, железа, углерода или галлия, ^{18}F , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{124}I , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{11}C , ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{114}In , ^{125}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{123}I , ^{32}Cl , ^{33}Cl , ^{34}Cl , ^{74}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{78}Br , ^{89}Zr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac или ^{153}Sm .

В соответствии с определенными вариантами осуществления радиоактивное средство конъюгировано с аднектином в одном или нескольких аминокислотных остатках. В соответствии с определенными вариантами осуществления один или несколько, как например, два или более, три или более, четыре или более или большее число радионуклидов могут присутствовать в меченом зонде. В соответствии с определенными вариантами осуществления радионуклид прикреплен непосредственно к аднектину с помощью хелатирующего средства (например, см. патент США № 8808665). В соответствии с определенными вариантами осуществления радионуклид присутствует в простетической группе, конъюгированной с аднектином с помощью бифункционального хелатирующего или конъюгирующего (BFC) фрагмента. В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатирующее средство для радионуклида и/или конъюгирующий фрагмент представляет собой хелатирующие средства на основе DFO, DOTA и его производных (CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, оксо-DO3A), DBCO, TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar и производных, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA и производных (DATA), H₂dedpa, H₄octapa, H₂azapa, H₅decapa, H₆phospa, HBED, SHBED, BPCA, CP256, PCTA, HEHA, PEPA, EDTA, TETA и TRITA, а также их близкие аналоги и производные.

В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатирующий или конъюгирующий (BFC) фрагмент для радионуклида представляет собой малеимид-NODAGA или малеимид-DBCO, который может быть ковалентно прикреплен к полипептиду через цистеиновые остатки вблизи С-конца полипептида. В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 модифицирован на его С-конце посредством добавления цистеина. Например, RxCy может быть связан со стороны С-конца с аминокислотными остатками NYRT, причем R представляет собой пролин, C представляет собой цистеин, а x и y представляют собой целые числа, которые равны по меньшей мере 1. Иллюстративные аднектины к PD-L1, имеющие аминокислотные остатки PC на своем С-конце, изложены в разделе Примеры. Можно обеспечить реакцию молекулы малеимид-NODAGA или малеимид-DBCO с цистеином с получением на выходе молекулы аднектин-NODAGA или аднектин-DBCO, соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатирующее средство для радионуклида представляет собой DFO, который может быть прикреплен, например, на произвольных поверхностных лизинах.

В соответствии с определенными вариантами осуществления хелатор для ^{64}Cu представляет собой DOTA, NOTA, EDTA, Df, DTPA или TETA. Подходящие комбинации хелатирующих средств и радионуклидов всесторонне обсуждаются в Price et al., Chem Soc Rev 2014; 43:260-90.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектин к PD-L1 метят с использованием PET маркера ^{18}F . ^{18}F представляет собой привлекательный радионуклид для PET с периодом радиоактивного распада, составляющим 1,8 ч, который обеспечивает инструмент для визуализации, осуществляемой в тот же день, что и его введение, причем радионуклид для PET лучше соответствует периоду полувыведения аднектина из организма, что дает результате отличные изображения с меньшим воздействием радиации на пациента. PD-L1 аднектин можно метить простетической группой, такой как [^{18}F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин ([^{18}F]-FFPEGA), как дополнительно описано в разделе Примеры. Как дополнительно показано в разделе Примеры, меченый ^{18}F аднектин к PD-L1 специфично и эффективно метит положительные по человеческому PD-L1 опухоли у мышей и положительные по PD-L1 опухоли у особей яванского макака. Конкретные подробности способа мечения представлены ниже и в разделе Примеры.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство для PD-L1 представляет собой аднектин к PD-L1, который метят ^{64}Cu , например, как описано в разделе Примеры. ^{64}Cu может быть связан с аднектином с использованием хелатирующего средства, такого как NODAGA. Как дополнительно показано в разделе Примеры, меченый ^{64}Cu аднектин к PD-L1 специфично и эффективно метит положительные по человеческому PD-L1 опухоли у мышей и положительные по PD-L1 опухоли у яванского макака.

Также можно применять другие известные в уровне техники способы мечения полипептидов радионуклидами, такими как Си и F, для синтеза визуализирующих средств на основе аднектина к PD-L1, описанных в данном документе. См., например, заявку на патент США № US 2014/0271467; Gill et al., Nature Protocols 2011; 6:1718-25; Bemdt et al. Nuclear Medicine and Biology 2007; 34:5-15, Inkster et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013; 23:3920-6, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство для PD-L1 содержит молекулу PEG (например, PEG с массой 5 кДа, PEG с массой 6 кДа, PEG с массой 7 кДа, PEG с массой 8 кДа, PEG с массой 9 кДа или PEG с массой 10 кДа) для повышения PK визуализирующего сред-

ства в крови с помощью небольших приращений, чтобы усилить контрастность при визуализации или повысить avidность визуализирующего средства на основе аднектина к PD-L1.

Введение и визуализация

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченые аднектины к PD-L1 можно применять для визуализации положительных по PD-L1 клеток или тканей, например, экспрессирующих PD-L1 опухолей. Например, меченый аднектин к PD-L1 вводят субъекту в количестве, достаточном для поглощения меченого аднектина в ткань, представляющую интерес (например, экспрессирующую PD-L1 опухоль). Затем субъекта подвергают визуализации с применением системы для визуализации, такой как PET, в течение периода времени, подходящего для конкретного применяемого радионуклида. Связавшие меченый аднектин к PD-L1 клетки или ткани, экспрессирующие PD-L1, например экспрессирующие PD-L1 опухоли, затем выявляют с помощью системы для визуализации.

Визуализацию с помощью PET с использованием визуализирующего средства для PD-L1 можно применять для качественного или количественного выявления PD-L1. Визуализирующее средство для PD-L1 можно применять в качестве биологического маркера, и наличие или отсутствие PD-L1-положительного сигнала у субъекта может быть показателем того, что субъект, например, будет отвечать на заданную терапию, например, противораковую терапию, или что субъект отвечает или не отвечает на терапию.

В соответствии с определенными вариантами осуществления прогресс или регресс заболевания (например, опухоли) может быть визуализирован в виде зависимости от времени или лечения. Например, можно отслеживать размер опухоли у субъекта, подвергающегося противораковой терапии (например, химиотерапии, радиотерапии), и степень регрессии опухоли можно отслеживать в реальном масштабе времени на основании выявления меченого аднектина к PD-L1.

Количество, эффективное для того, чтобы приводить в результате к поглощению визуализирующего средства (например, визуализирующего средства на основе ^{18}F -аднектина, визуализирующего средства на основе ^{64}Cu -аднектина) в представляющие интерес клетки или ткань (например, опухоли), может зависеть от ряда факторов, в том числе, например, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона реципиента; времени введения; пути введения; скорости экскреции конкретного используемого зонда; длительности лечения; наличия других лекарственных средств, применяемых в комбинации или одновременно с конкретной используемой композицией; и других факторов.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализацию тканей, экспрессирующих PD-L1, осуществляют до, во время и после введения меченого аднектина к PD-L1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например человека, собаку, кошку, человекообразную обезьяну, обезьяну, крысу или мышь.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, являются пригодными для визуализации с помощью PET легких, сердца, почек, печени и кожи, а также других органов или опухолей, ассоциированных с этими органами, которые экспрессируют PD-L1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующие средства для PD-L1 обеспечивают контрастность, составляющую по меньшей мере 50%, 75%, 2, 3, 4, 5 или более. В разделе Примеры показано, что все аднектины к PD-L1, которые применялись, обеспечивали контрастность при PET, составляющую 2 или более, и что аффинность аднектинов не имела значения.

В случае применения для визуализации (например, PET) радионуклидов с коротким периодом полураспада (например, ^{18}F) меченые радиоактивным изотопом аднектины к PD-L1 предпочтительно вводят внутривенно. Другие пути введения также являются подходящими и зависят от периода полураспада применяемых радионуклидов.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующие средства для PD-L1, описанные в данном документе, применяют для выявления положительных по PD-L1 клеток у субъекта посредством введения субъекту визуализирующего средства для PD-L1, раскрытого в данном документе, и выявления визуализирующего средства, причем выявленное визуализирующее средство определяет положение положительных по PD-L1 клеток у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство выявляют с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующие средства для PD-L1, описанные в данном документе, применяют для выявления экспрессирующих PD-L1 опухолей у субъекта посредством введения субъекту визуализирующего средства для PD-L1, раскрытого в данном документе, и выявления визуализирующего средства, причем выявленное визуализирующее средство определяет положение опухоли у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления визуализирующее средство выявляют с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления изображение визуализирующего средства для PD-L1, описанного в данном документе, получают посредством введения субъекту визуализирующего средства и визуализации *in vivo* распространения визуализирующего средства с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

В данном документе раскрыты способы получения количественно оцениваемого изображения тканей или клеток, экспрессирующих PD-L1, причем способ предусматривает приведение клеток или ткани в контакт с визуализирующим средством для PD-L1, описанным в данном документе, и выявление или количественную оценку ткани, экспрессирующей PD-L1, с применением позитронно-эмиссионной томографии.

В данном документе также раскрыты способы выявления экспрессирующей PD-L1 опухоли, предусматривающие введение эффективного для визуализации количества визуализирующего средства для PD-L1, описанного в данном документе, субъекту, имеющему экспрессирующую PD-L1 опухоль, и выявление радиоактивного излучения указанного визуализирующего средства в опухоли с применением позитронно-эмиссионной томографии, причем радиоактивное излучение выявляют в опухоли.

В данном документе также раскрыты способы диагностики наличия экспрессирующей PD-L1 опухоли у субъекта, причем способ предусматривает:

(а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, визуализирующего средства для PD-L1, описанного в данном документе; и

(b) получение сформированного за счет радиоактивного излучения изображения по меньшей мере части субъекта для выявления наличия или отсутствия визуализирующего средства;

причем наличие и положение визуализирующего средства на уровне выше фонового является показателем наличия и положения заболевания.

В данном документе также раскрыты способы мониторинга прогресса противоопухолевой терапии в отношении экспрессирующих PD-L1 опухолей у субъекта, причем способ предусматривает:

(а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, визуализирующего средства для PD-L1, описанного в данном документе, в первый момент времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения размера опухоли;

(b) назначение субъекту противоопухолевой терапии;

(с) введение субъекту визуализирующего средства в один или несколько последующих моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени;

причем размер и положение опухоли в каждый момент времени являются показателями прогресса заболевания.

Визуализация с помощью PET

Как правило, в контексте визуализации с помощью PET желательным является обеспечение реципиента дозой аднектина, которая находится в диапазоне от приблизительно 1 до 200 мг в виде одной внутривенной инфузии, хотя более низкую или более высокую дозу также можно вводить, если этого требуют обстоятельства. Как правило, желательным является обеспечение реципиента дозой, которая находится в диапазоне от приблизительно 1 до 10 мг белка или пептида на квадратный метр площади поверхности тела для типичного взрослого, хотя более низкую или более высокую дозу также можно вводить, если этого требуют обстоятельства. Примеры доз белков или пептидов, которые можно вводить субъекту-человеку с целью визуализации, составляют приблизительно 1-200 мг, приблизительно 1-70 мг, приблизительно 1-20 мг и приблизительно 1-10 мг, хотя также можно применять более высокие или более низкие дозы.

В соответствии с определенными вариантами осуществления введение осуществляется в количестве меченого радиоактивным изотопом аднектина, составляющем от приблизительно 0,005 мкг/кг массы тела до приблизительно 50 мкг/кг массы тела в сутки, обычно от 0,02 мкг/кг массы тела до приблизительно 3 мкг/кг массы тела. Масса, ассоциированная с PET маркером, присутствует в форме природного изотопа (например, ^{19}F вместо ^{18}F в PET маркере). Конкретная аналитическая доза для настоящей композиции включает в себя от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мкг меченого радиоактивным изотопом белка. Обычно доза может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 50 мкг меченого радиоактивным изотопом белка.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального выявляемого количества для получения четкого изображения ткани или клеток, которые поглощают меченый радиоактивным изотопом аднектин. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически раздельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, которым следует вводить меченый радиоактивным изотопом аднектин. Требования к единичным лекарственным формам, описанным в данном документе, диктуются и непосредственно зависят от (а) характерных особенностей нацеливающей части меченого радиоактивным изотопом аднектина; (b) ткани или клеток, являющихся мишенью; (с) ограничений, присущих применяемой технологии визуализации.

В случае введения меченого радиоактивным изотопом аднектина применяемая доза будет зависеть от типа заболевания, применяемого нацеливающего соединения, возраста, физического состояния и пола субъекта, степени тяжести заболевания, области, подлежащей оценке, и прочего. В частности, следует уделить достаточное внимание экспозиционным дозам у субъекта. Предпочтительно, насыщающую дозу радиоактивной метки (например, ^{18}F или ^{64}Cu) вводят пациенту. Например, величина радиоактивности

меченого ^{18}F аднектина обычно лежит в диапазоне от 3,7 мегабеккереля до 3,7 гигабеккереля и предпочтительно от 18 мегабеккерелей до 740 мегабеккерелей. В качестве альтернативы, доза может быть измерена, например, в милликюри. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления величина дозы ^{18}F для визуализации, вводимой при исследованиях визуализации, составляет от 5 до 10 мКи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество будет представлять собой количество соединения, достаточное для получения доз излучения в диапазоне приблизительно 1-5 мКи.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, можно изменять с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого поглощения меченого радиоактивным изотопом аднектина в клетках или тканях конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсичным для пациента. Тем не менее, будет понятно, что общее суточное применение меченого радиоактивным изотопом аднектина в соответствии с настоящим раскрытием будет определяться решением лечащего врача или другого ответственного специалиста по результатам тщательной медицинской оценки. Конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного субъекта будет зависеть от ряда факторов, в том числе, например, активности конкретной используемой композиции; конкретной используемой композиции; возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона реципиента; времени введения; пути введения; скорости экскреции конкретного используемого соединения; длительности лечения; других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов, известных в области медицины. В соответствии с определенными вариантами осуществления количество меченого радиоактивным изотопом аднектина, вводимого человеческому субъекту, которое требуется для визуализации, будет определено лечащим врачом, причем доза обычно варьирует в соответствии с величиной излучения от радионуклида.

Композицию, описанную в данном документе, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из ряда способов, известных в уровне техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для меченого радиоактивным изотопом аднектина, описанного в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы, описанный в данном документе меченый радиоактивным изотопом аднектин можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или муккозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченый радиоактивным изотопом аднектин, описанный в данном документе, может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распространение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Средства могут пересекать BBB при составлении их, например, в липосомах. По поводу способов получения липосом, см., например, патенты США №№ 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым повышая целенаправленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 за авторством Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор сурфактантного белка A (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994).

Иллюстративная процедура PET

Следующую иллюстративную процедуру можно использовать при проведении исследований визуализации с помощью PET на пациентах в клинических условиях. Двухдюймовый внутривенный катетер размером 20 G вводят в контралатеральную локтевую вену для введения радиоактивного маркера. Введение PET маркера часто синхронизируют по времени, чтобы оно совпадало со временем достижения максимальной (T max) или минимальной (T min) концентрации аднектина к PD-L1 в крови.

Пациента помещают в PET камеру и индикаторную дозу PET маркера на основе меченого радиоактивным изотопом аднектина к PD-L1, такого как [^{18}F]-ADX_5417_E01 (<20 мКи) вводят через внутри-

венный катетер. Образцы либо артериальной, либо венозной крови берут с 15 соответствующими временными интервалами во время ПЕТ-сканирования с целью анализа и количественного определения доли не подвергшегося метаболизации ПЕТ маркера [^{18}F]-ADX_5417_E01 в плазме. Изображения получают в течение периода до 120 мин. В течение 10 мин от инъекции радиоактивного маркера и при окончании сеанса визуализации 1 мл образцы крови получают для определения концентрации в плазме любого немеченого аднектина к PD-L1, который, возможно, вводили перед ПЕТ маркером.

Томографические изображения получают посредством реконструкции изображения. В случае определения распространения радиоактивного маркера представляющие интерес участки (ROI) проявляются на реконструированном изображении, в том числе без ограничения легкие, печень, сердце, почка, кожа или другие органы и ткань (например, ткань злокачественной опухоли). Значения поглощения радиоактивного маркера со временем в этих участках используют для построения кривых зависимости активности от времени (ТАС), полученных в отсутствие какого-либо вмешательства или в присутствии немеченого аднектина к PD-L1 при различных оцениваемых моделях дозирования. Данные выражены в виде радиоактивности за единицу времени на единицу объема ($\text{мКи}/\text{см}^3/\text{мКи}$ введенной дозы).

Х. Выявление PD-L1 с использованием аднектинов к PD-L1

Помимо выявления PD-L1 *in vivo*, аднектины к PD-L1, такие как описанные в данном документе, можно применять для выявления молекулы-мишени в образце. Способ может предусматривать приведение образца в контакт с аднектинами к PD-L1, описанными в данном документе, причем указанное приведение в контакт выполняют в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса аднектин к PD-L1-мишень; и выявление указанного комплекса, тем самым выявляя указанную мишень в указанном образце. Выявление можно выполнять с помощью любой методики, известной в уровне техники, такой как, например, радиография, иммунологический анализ, выявление флуоресценции, масс-спектроскопия или поверхностный плазмонный резонанс. Образец может быть получен от человека или другого млекопитающего. В случае диагностических целей соответствующими средствами являются выявляемые метки, которые включают в себя радиоактивные изотопы для визуализации всего тела и радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие маркирующие антитело элементы для анализа образцов.

Выявляемые метки могут относиться к различным типам, используемым в настоящее время в области *in vitro* диагностики, включая метки на основе частиц, в том числе золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как I^{125} или Tc^{99} , присутствующие, например, с пептидным хелатирующим средством типа N_2S_2 , N_3S или N_4 , хромофоры, в том числе флуоресцентные маркеры, биотин, люминесцентные маркеры, фосфоресцирующие маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают заданный субстрат в выявляемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Биотинилированное антитело затем будет выявляться по связыванию с авидином или стрептавидином. Подходящие ферментные метки включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, выявляемую посредством измерения наличия или появления хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантил-метокси-фосфорилокси-фенилдиоксетан (AMPPD), динатрия 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1^{3,7}}декан}-4-ил)фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, хелатов подходящих лантаноидов, таких как тербий(III) и европий(III). Другие метки включают в себя метки, изложенные в разделе, касающемся визуализации. Средства для выявления определяются выбранной меткой. Появление метки или продуктов ее реакции можно оценить невооруженным глазом в случае, когда метка представляет собой материал в виде частиц и накапливается при соответствующих уровнях, или с использованием инструментов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., причем все они соответствуют стандартной практике.

В соответствии с определенными вариантами осуществления методы конъюгирования приводят в результате к связям, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например, пептидные (т.е. амидные), сульфидные, (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Эти связи являются почти неиммуногенными и проявляют приемлемую стабильность в сыворотке (см., например, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; международные заявки WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от химической природы фрагмента и аднектина можно использовать разные стратегии конъюгирования. В случае, если фрагмент представляет собой встречающийся в естественных условиях или рекомбинантный полипептид длиной 50-500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, описывающих химические особенности синтеза белковых конъюгатов, которым легко может следовать специалист в данной области техники (см., например, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). В соответствии с одним вариантом осуществления используется реакция малеинимидофрагмента с цистеиновым остатком в аднектине или фрагменте. В качестве альтернативы, выполняют связывание с С-концом аднектина. С-концевую модификацию белка можно выполнить, как описано, например, в Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-

3371). В случае, когда фрагмент представляет собой пептид или полипептид, аднектин и фрагмент могут быть слиты с помощью стандартного генетического слияния, необязательно с использованием линкера, раскрытого в данном документе.

В целом, сайт-специфичная реакция и ковалентное связывание основываются на превращении природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является нетипичной для реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в редком контексте последовательности может подвергаться ферментативному превращению в альдегид (см. Frese, M. A., и Dierks, T., *ChemBioChem*. 10 (2009) 425-427). Также возможно получить желательную модификацию аминокислоты при использовании специфичной ферментативной активности определенных ферментов в отношении реакции с природной аминокислотой в заданном контексте последовательности (см., например, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136. Катализируемое протеазой образование C--N связей описано в Bordusa, E., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403).

Сайт-специфичной реакции и ковалентного связывания также можно достичь с помощью селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами. Способность N-концевого цистеина к реакции с бензонитрилами (см., Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) можно использовать для достижения сайт-специфичного ковалентного связывания. Простое химическое лигирование также основывается на C-концевых цистеиновых остатках (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). В европейском патенте EP 1074563 описывается метод конъюгирования, который основывается на более быстрой реакции цистеина в пределах отрезка из отрицательно заряженных аминокислот, чем цистеина, расположенного в отрезке из положительно заряженных аминокислот.

Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или пептидомиметик. В случае, если полипептид является химически синтезированным, аминокислоты с нетипичной химической реакционной способностью могут быть включены в ходе синтеза (см., например, de Graaf, A. J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Поскольку речь идет о широком спектре нетипичных функциональных групп, и их можно вводить в синтетический пептид, конъюгирование такого пептида с линкером является стандартной химической процедурой.

Для получения меченого одной меткой полипептида конъюгат со стехиометрическим соотношением 1:1 можно отделить от других побочных продуктов с помощью хроматографии. Эту процедуру может облегчить применение меченого красителем связывающего элемента в составе пары и заряженного линкера. При использовании данного вида меченого и имеющего сильный отрицательный заряд связывающего элемента в составе пары конъюгированные с одной меткой полипептиды легко отделяются от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более чем один линкер, поскольку различие в заряде и молекулярном весе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязавшихся компонентов, таких как меченый моновалентный связывающий элемент.

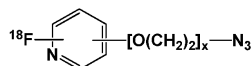
XI. Синтез меченых ^{18}F аднектинов к PD-L1

Меченые ^{18}F аднектины к PD-L1 можно синтезировать, вначале получая меченую радиоактивным изотопом ^{18}F простетическую группу, обеспечивая связывание аднектина с бифункциональным хелатирующим средством, а затем объединяя эти два реагента (см., например, фиг. 9).

Меченые радиоактивным изотопом ^{18}F простетические группы В соответствии с одним аспектом в данном документе представлено меченое радиоактивным изотопом ^{18}F соединение, содержащее простетическую группу для применения в биоортогональной реакции, включающей 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и циклооктином, которое протекает селективно в условиях, допускающих присутствие воды. Меченые радиоактивным изотопом ^{18}F простетические группы, которые раскрыты в данном документе, являются на 100% растворимыми в водных средах, и нет потребности в органической фазе для связывания простетических групп с аднектинами к PD-L1, раскрытыми в данном документе. Это свойство является особенно преимущественным, поскольку нет потребности в органической фазе для связывания простетической группы с аднектинами к PD-L1, которые не могут выдерживать даже небольшие количества органических растворителей вследствие проблем с деградацией и агрегацией.

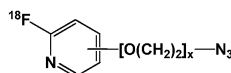
Кроме того, в отличие от алифатических простетических групп реакцию фторирования с использованием ^{18}F можно отслеживать с использованием UV, и меченые радиоактивным изотопом ^{18}F простетические группы, описанные в данном документе, не являются летучими. Более того, меченые радиоактивным изотопом ^{18}F простетические группы могут быть включены в аднектины к PD-L1 с применением реакции клик-химии без использования меди, например, как описано в разделе Примеры, тем самым избегая проблем со стабильностью, наблюдаемых в некоторых биологических системах при использовании реакций клик-химии, опосредуемых медью.

В соответствии с одним аспектом в данном документе представлен пегилированный ^{18}F -пиридин, ковалентно связанный с азидом со следующей структурой:



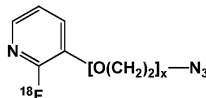
где x представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В соответствии с определенными вариантами осуществления x равно 4. В соответствии с определенными вариантами осуществления ^{18}F прикреплен к пиридину в орто-положении относительно атома N. В соответствии с определенными вариантами осуществления фрагмент $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-3 относительно азота на пиридиновом кольце. В соответствии с определенными вариантами осуществления фрагмент $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-2 относительно азота на пиридиновом кольце. В соответствии с определенными вариантами осуществления фрагмент $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-4 относительно азота на пиридиновом кольце.

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченое радиоактивным изотопом ^{18}F соединение имеет структуру



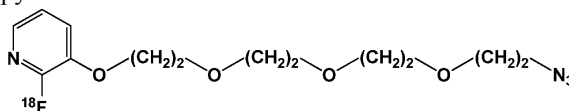
где x представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В соответствии с определенными вариантами осуществления x равно 4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченое радиоактивным изотопом ^{18}F соединение имеет структуру



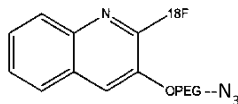
где x представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В соответствии с определенными вариантами осуществления x равно 4.

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченое радиоактивным изотопом ^{18}F соединение представляет собой [^{18}F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин (^{18}F -FPPEGA) и имеет структуру



В соответствии с определенными вариантами осуществления меченая радиоактивным изотопом ^{18}F простетическая группа может содержать дополнительные группы на пиридиновом кольце, которые не препятствуют реакции фторирования. В соответствии с определенными вариантами осуществления присоединяемые к пиридиновому кольцу группы включают в себя C_{1-6} алкильные группы, например метил, этил и пропил.

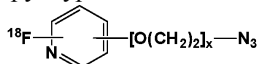
В соответствии с определенными вариантами осуществления меченая радиоактивным изотопом ^{18}F простетическая группа представляет собой конденсированную кольцевую систему со следующей структурой:



где "OPEG" представляет собой $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$, и x представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В соответствии с определенными вариантами осуществления x равно 4.

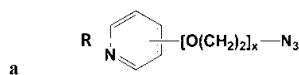
Меченые радиоактивным изотопом ^{18}F простетические группы, описанные в данном документе, могут быть получены с применением химических реакций, описанных в разделе Примеры в данном документе.

В данном документе также представлен способ получения пегилированного ^{18}F -пиридина, ковалентно связанного с азидом со следующей структурой:

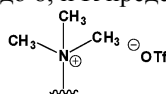


где x представляет собой целое число от 1 до 8, причем способ предусматривает стадии:

(a) обеспечение раствора соединения a со следующей структурой:



где x представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой NO₂, Br, F или



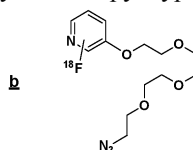
и находится в орто-положении относительно атома N в пиридиновом кольце;

(b) обеспечение смеси ¹⁸F в ¹⁸O-воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозане и слабом основании;

с) высушивание смеси со стадии b) с образованием твердого вещества и

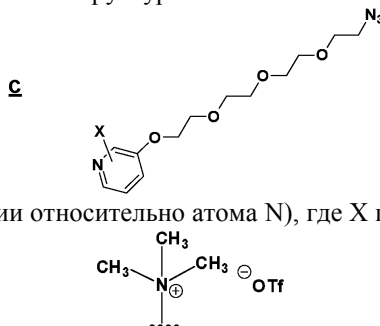
d) осуществление реакции раствора со стадии a) с твердым веществом со стадии c) с образованием меченого ¹⁸F соединения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления согласно способу получают простетическую группу на основе ¹⁸F-пиридина со следующей структурой **b**

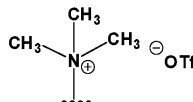


где ¹⁸F находится в орто-положении относительно атома N, и способ включает в себя стадии:

a) обеспечение раствора соединения со структурой



(где X находится в орто-положении относительно атома N), где X представляет собой NO₂, Br или

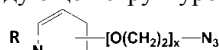


b) обеспечение смеси ¹⁸F в ¹⁸O-воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозане и слабом основании, таком как K₂CO₃;

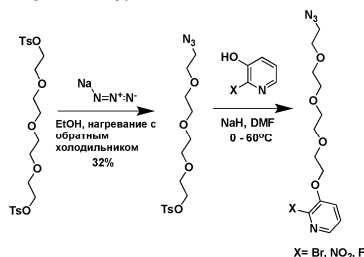
с) высушивание смеси со стадии b) с образованием твердого вещества и

d) осуществление реакции раствора со стадии a) с твердым веществом со стадии c) с образованием меченого ¹⁸F соединения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способом дополнительно предусматривается стадия получения соединения со следующей структурой **a**:

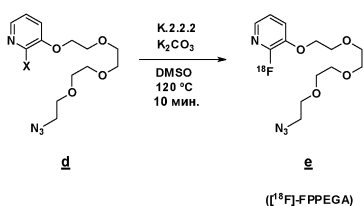


в соответствии со схемой I, показанной ниже:



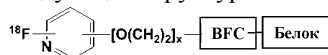
X = Br, NO₂, F

В соответствии с определенными вариантами осуществления способом предусматривается получение простетической группы на основе F-пиридина, которая представляет собой [¹⁸F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин (¹⁸F-FPPEGA), **e**, из **d** в соответствии со следующими условиями реакции:



Меченые радиоактивным изотопом ^{18}F PD-L1 аднектины

В соответствии с некоторыми аспектами в данном документе представлены меченые радиоактивным изотопом ^{18}F зонды или средства со следующей структурой:



где белок представляет собой PD-L1 аднектин, и x представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с определенными вариантами осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления x равно 4.

BFC

Бифункциональные хелатирующие или конъюгирующие (BFC) фрагменты, которые можно применять в композициях с радиоактивной меткой ^{18}F , раскрытых в данном документе, являются коммерчески доступными (например, Sigma Aldrich; Click Chemistry Tools) или могут быть синтезированы в соответствии с хорошо известными химическими реакциями.

В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC выбран из хелатирующих средств на основе циклооктина (например, DBCO, DIBO), хелатирующих средств на основе DFO, DOTA и его производных (CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, оксо-DO3A), TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar и производных, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA и производных (DATA), H_2dedpa , H_4octa , H_2azapa , H_3deca , H_6phospa , HBED, SHBED, BPCA, CP256, PCTA, HENA, PEPA, EDTA, TETA и TRITA, а также их близких аналогов и производных. Подходящие комбинации хелатирующих средств и радионуклидов всесторонне описаны в Price et al., Chem Soc Rev 2014; 43: 260-90.

В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой циклооктин, содержащий реакционноспособную группу, которая образует ковалентную связь с аминной, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой на белке или пептиде. Реакционноспособные группы на циклооктине включают в себя сложные эфиры, кислоты, гидроксильные группы, аминоксигруппы, малеимиды, α -галогенкетоны и α -галогенацетамиды.

В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой циклооктин, который представляет собой дибензоциклооктин (DIBO), биарилазациклооктинон (BARAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC) и дибензоциклооктин (DBCO). В соответствии с определенными вариантами осуществления циклооктин представляет собой DBCO.

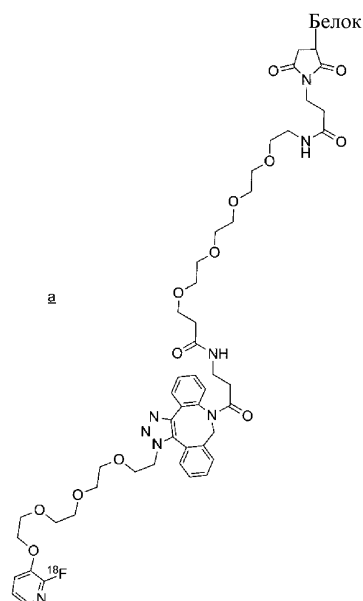
В соответствии с определенными вариантами осуществления циклооктин содержит гидрофильную спейсерную "ножку" на основе полиэтиленгликоля (PEG) $_y$, где y представляет собой целое число от 1 до 8. В соответствии с определенными вариантами осуществления y представляет собой целое число от 2 до 6. В соответствии с определенными вариантами осуществления y равно 4 или 5.

В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир или DBCO-сульфо-NHS-сложный эфир, который специфично и эффективно реагирует с первичным амином (например, боковой цепью лизиновых остатков или покрытыми аминоксиланом поверхностями). В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-кислоту с концевой карбоновой кислотой (-COOH), которую можно привести в реакцию с первичными или вторичными аминогруппами в присутствии активаторов (например, EDC) с образованием стабильной амидной связи. В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-амин, который реагирует с карбоксильными группами в присутствии активаторов (например, EDC или DCC) или с активированными сложными эфирами (например, сложными NHS-эфирами) с образованием стабильных амидных связей.

В соответствии с определенными вариантами осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-малеимид, который реагирует с сульфгидрильными группами на цистеиновых остатках, например, на С-конце полипептида или вблизи него.

В соответствии с определенными вариантами осуществления полипептид модифицирован на его С-конце посредством прикрепления цистеина. Например, P_mC_n может быть связан с С-концевым аминокислотным остатком в полипептиде, причем P представляет собой пролин, C представляет собой цистеин, m представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 0, и n представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 1. Способы выполнения таких модификаций являются хорошо известными в уровне техники.

В соответствии с определенными вариантами осуществления меченый радиоактивным изотопом ^{18}F зонд или средство имеет следующую структуру а:



где BFC конъюгирован с белком (например, аднектином к PD-L1) по цистеиновому остатку.

Меченые радиоактивным изотопом ^{18}F нацеливающие средства, описанные в данном документе, получают с помощью биоортогональных реакций клик-химии без использования металлов в среде, подходящей для непосредственного применения *in vivo* (например, в солевом растворе), в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

XII. Терапевтические способы

Иммунотерапия у пациентов со злокачественной опухолью с применением аднектина к PD-L1

PD-L1 представляет собой основной лиганд PD-1, уровень которого повышен в солидных опухолях, где он может ингибировать продукцию цитокинов и цитолитическую активность PD-1-положительных инфильтрирующих в опухоль CD4^+ и CD8^+ Т-клеток соответственно (Dong et al., 2002; Hino et al., 2010; Taube et al., 2012). Эти свойства делают PD-L1 перспективной мишенью для иммунотерапии злокачественных опухолей. Например, клинические испытания иммунотерапии против PD-L1, которые описаны в международной заявке № WO 2013/173223, которая включена в данный документ посредством ссылки в своей полноте, демонстрируют, что блокада с помощью mAb ингибирующего иммунную систему лиганда, PD-L1, дает как устойчивую регрессию опухоли, так и длительную (> 24 недель) стабилизацию у пациентов с метастатическими NSCLC, MEL, RCC и OV, в том числе у пациентов с длительной предшествующей терапией. Соответственно, целенаправленное воздействие на PD-L1, например, с применением аднектинов PD-L1, является подходящим для того, чтобы вызывать противоопухолевую реакцию.

Исходя из клинических данных, раскрытых в международной заявке WO 2013/173223, в данном документе описаны способы иммунотерапии у субъекта, пораженного злокачественной опухолью, причем способ предусматривает введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество PD-L1 аднектина, описанного в данном документе. Настоящим раскрытием также предполагается способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту PD-L1 аднектина, описанного в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека.

Подробные способы лечения субъекта со злокачественной опухолью посредством целенаправленного воздействия на PD-L1 описаны в международной заявке WO 2013/173223.

В соответствии с определенными вариантами осуществления PD-L1 аднектины, описанные в данном документе, которые являются подходящими для применения в способах, описанных в данном документе, имеют один или несколько из следующих признаков: высокая аффинность в отношении человеческого PD-L1, повышение пролиферации Т-клеток, повышение секреции IL-2, например, из Т-клеток, повышение продукции интерферона- γ , например, из Т-клеток, ингибирование связывания PD-L1 с PD-1 и обращение супрессирующего эффекта регуляторных Т-клеток в отношении эффекторных Т-клеток и/или дендритных клеток.

Конъюгаты аднектин-лекарственное средство (аднектин-DC)

Аднектины, описанные в данном документе, могут быть конъюгированы через цистеин, например, С-концевой цистеин, с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат аднектин-лекарственное средство ("аднектин-DC").

В аднектин-DC аднектин конъюгирован с лекарственным средством, причем аднектин-DC функционирует в качестве нацеливающего средства для направления аднектина к клетке-мишени, экспрессирующей свой антиген, такой как клетка злокачественной опухоли. Предпочтительно антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, т.е. антиген, который экспрессируется или сверхэкспрессируется

руется исключительно клеткой злокачественной опухоли. Попад туда, лекарственное средство высвобождается либо внутри целевой клетки, либо вблизи нее, действуя как терапевтическое средство. Для обзора механизма действия и применения конъюгатов лекарственных средств, которые применяются с антителами, например, в терапии злокачественных опухолей, см. Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.

Подходящие терапевтические средства для применения в конъюгатах с лекарственными средствами включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, ДНК-сшивающие средства, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимиотические средства. В аднектин-DC аднектин и терапевтическое средство предпочтительно конъюгированы посредством расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно, линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 169), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. Аднектин-DC могут быть получены в соответствии со способами, подобными описанным в патентах США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; в РСТ публикациях международных заявок WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях заявок на патент США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Сам линкер может быть связан, например, ковалентно связан, например, с применением химического средства на основе малеимида, с цистеином в полипептиде, например цистеином на С-конце полипептида или возле него, например цистеином во фрагменте P_mC_n , который прикреплен к С-концевому аминокислотному остатку в полипептиде, где m представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 0 (например, 0, 1 или 2), и n представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 1 (например, 1 или 2). Например, линкер может быть ковалентно связан с цистеином, таким как цистеин в С-концевом участке аднектина, например, С-концевым цистеином в РС у аднектин-DC- P_mC_n , где m и n независимо представляют собой целое число, которое равно по меньшей мере один. Например, линкер может быть связан с аднектин-DC- P_mC_n , где P представляет собой пролин, C представляет собой цистеин, а m и n представляют собой целые числа, которые равны по меньшей мере 1, например 1-3. В соответствии с определенными вариантами осуществления m равно нулю, т.е. цистеину не предшествует пролин. Лигирование с цистеином можно проводить, как известно в уровне техники, с применением химического средства на основе малеимида (например, Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). Для прикрепления линкера к цистеину на аднектине линкер, например, может содержать малеинимидофрагмент, причем данный фрагмент затем реагирует с цистеином с образованием ковалентной связи. В соответствии с определенными вариантами осуществления аминокислоты, окружающие цистеин, оптимизированы для облегчения химической реакции. Например, цистеин может быть окружен отрицательно заряженными аминокислотами для более быстрой реакции по сравнению с цистеином, который окружен отрезком положительно заряженных аминокислот (европейский патент EP 1074563).

В случае лечения злокачественных опухолей лекарственное средство предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель подвергшейся целенаправленному воздействию клетки злокачественной опухоли. Цитотоксические лекарственные средства, которые можно применять в аднектин-DC, включают в себя следующие типы соединений, а также их аналоги и производные:

(а) енедины, такие как калихеамицин (см., например, Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3464 и 3466) и унциаламицин (см., например, Davies et al., международная заявка № WO 2007/038868 A2 (2007), и Chowdari et al., патент США № US 8709431 B2 (2012));

(b) тубулизины (см., например, Domling et al., патент США № US 7778814 B2 (2010); Cheng et al., патент США № US 8394922 B2 (2013) и Cong et al., заявка на патент США № US 2014/0227295 A1;

(с) СС-1065 и дуокармицин (см., например Boger, патент США № US 6545853 B1 (2003); Sufi et al., патент США № US 8461117 B2 (2013) и Zhang et al., заявка на патент США № US 2012/0301490 A1 (2012));

(d) эпотилоны (см., например, Vite et al., заявка на патент США № US 2007/0275904 A1 (2007) и патентный документ США № US RE42930 E (2011));

(е) ауристатины (см., например, Senter et al., патент США № US 6844869 B2 (2005) и Doronina et al., патент США № US 7498298 B2 (2009));

(f) димеры пирролобензодиазепина (PBD) (см., например, Howard et al., заявка на патент США № US 2013/0059800 A1 (2013); заявка на патент США № US 2013/0028919 A1 (2013) и международная заявка № WO 2013/041606 A1 (2013)); и

(g) майтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., например, Chari et al., патент США № US 5208020 (1993) и Amphlett et al., патент США № US 7374762 B2 (2008)).

Иллюстративные злокачественные опухоли, лечение которых можно осуществлять с помощью PD-L1 аднектинов

PD-L1 аднектины, описанные в данном документе, могут быть подходящими для применения в лечении широкого спектра злокачественных опухолей, в том числе невосприимчивого к лечению метастатического NSCLC, которые обычно не считаются иммунореактивными. Иллюстративные злокачественные опухоли, лечение которых можно проводить с применением PD-L1 аднектинов, описанных в данном документе, включают в себя MEL (например, метастатическую злокачественную меланому), RCC, плоскоклеточный ороговевающий NSCLC, плоскоклеточный неороговевающий NSCLC, CRC, злокачественную опухоль яичника (OV), злокачественную опухоль желудка (GC), злокачественную опухоль молочной железы (BC), карциному поджелудочной железы (PC) и карциному пищевода. Кроме того, PD-L1 аднектины, описанные в данном документе, являются подходящими для применения в лечении невосприимчивых к лечению или рецидивирующих злокачественных новообразований.

Неограничивающие примеры злокачественных опухолей, лечение которых может осуществляться с применением PD-L1 аднектинов, исходя из данных об очень широкой применимости иммунотерапии в отношении PD-L1, раскрытых в международной заявке WO 2013/173223, включают в себя злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль головы или шеи, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль легкого, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль матки, кастрационно-резистентную злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль ободочной кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, карциномы яичника, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, хронические или острые лейкозы, в том числе острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, множественную миелому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе злокачественные опухоли, вызванные асбестом, метастатические злокачественные опухоли и любые комбинации указанных злокачественных опухолей. PD-L1 аднектины также являются применимыми для лечения метастатических злокачественных опухолей.

Комплексная терапия с использованием PD-L1 аднектинов

В соответствии с определенными вариантами осуществления PD-L1 аднектины, описанные в данном документе, можно сочетать с иммуногенным средством, например, препаратом из злокачественных клеток, очищенных опухолевых антигенов (в том числе рекомбинантных белков, пептидов и углеводных молекул), антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, несущие опухолеассоциированные антигены, и клеток, трансфицированных генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al, 2004). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF. Блокаду PD-L1 также можно эффективно сочетать со стандартными методами лечения злокачественных опухолей, в том числе химиотерапевтическими схемами, облучением, хирургическим вмешательством, гормональной депривацией и ингибиторами ангиогенеза, а также с другим иммунотерапевтическим антителом (например, Ab к PD-1, Ab к CTLA-4 и Ab к LAG-3).

Лекарственные препараты и применения аднектинов к PD-L1 Аднектин к PD-L1, описанный в данном документе, можно применять для получения лекарственного препарата для ингибирования передачи сигнала по пути с участием PD-1/PD-L1 с тем, чтобы благодаря этому усилить эндогенную иммунную реакцию у субъекта, пораженного злокачественной опухолью. Данным раскрытием также предполагается применение любого аднектина к PD-L1, описанного в данном документе, для получения лекарственного препарата для иммунотерапии у субъекта, пораженного злокачественной опухолью. Данным раскрытием предполагаются медицинские применения любого аднектина к PD-L1, описанного в данном документе, соответствующие всем вариантам осуществления способов лечения, в которых используется PD-L1 аднектин, описанный в данном документе.

В данном документе также описаны аднектины к PD-L1 для применения в лечении субъекта, пораженного злокачественной опухолью, которое предусматривают усиление эндогенной иммунной реакции

у субъекта, пораженного злокачественной опухолью, посредством ингибирования передачи сигнала по пути с участием PD-1/PD-L1. Данным раскрытием дополнительно предусматриваются аднектины к PD-L1 для применения в иммунотерапии у субъекта, пораженного злокачественной опухолью, которая предусматривает нарушение взаимодействия между PD-1 и PD-L1. Эти аднектины к PD-L1 можно применять в усилении эндогенной иммунной реакции против полного набора злокачественных опухолей, описанных в данном документе, или в иммунотерапии злокачественных опухолей, описанных в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления злокачественные опухоли включают в себя MEL (например, метастатическую злокачественную MEL), RCC, плоскоклеточный ороговевающий NSCLC, плоскоклеточный неороговевающий NSCLC, CRC, злокачественную опухоль яичника (OV), злокачественную опухоль желудка (GC), злокачественную опухоль молочной железы (BC), карциному поджелудочной железы (PC) и карциному пищевода.

Инфекционные заболевания

В данном документе также описаны способы лечения пациентов, которые подверглись воздействию конкретных токсинов или патогенов. Например, в соответствии с определенными аспектами данным раскрытием предполагается способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту аднектина к PD-L1, описанного в данном документе, в результате чего осуществляется лечение инфекционного заболевания у субъекта.

Аналогично обсуждаемому выше применению в отношении опухолей опосредованную аднектином блокаду PD-L1 можно применять саму по себе или в качестве адъюванта в комбинации с вакцинами для усиления иммунной реакции в отношении патогенов, токсинов и/или аутоантигенов. Примеры патогенов, в отношении которых данный терапевтический подход может быть особенно полезным, включают в себя патогены, против которых в настоящее время не существует эффективной вакцины, или патогены, против которых традиционные вакцины являются не вполне эффективными. Они включают в себя HIV (ВИЧ), гепатит (A, B и C), грипп, герпес, лямблию, малярию, лейшманию, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, но не ограничиваются ими. Блокада PD-L1 является особенно полезной против инфекций, вызываемых агентами, такими как HIV, которые презентуют измененные антигены в ходе развития инфекции. Новые эпитопы на этих антигенах распознаются как чужеродные в момент введения аднектина к PD-L1, тем самым провоцируя сильную Т-клеточную реакцию, которая не ослабляется отрицательными сигналами посредством пути с участием PD-1/PD-L1.

В вышеописанных способах блокада PD-L1 может сочетаться с другими формами иммунотерапии, известными в уровне техники, такими как лечение с использованием цитокинов (например, введение интерферонов, GM-CSF, G-CSF или IL-2).

XIII. Наборы и изделия

Аднектины к PD-L1, описанные в данном документе, могут быть обеспечены в виде набора, упакованной комбинации реактивов в предварительно определенных количествах с инструкциями к применению в терапевтических или диагностических способах, описанных в данном документе.

Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления предполагается изделие, содержащее материалы, пригодные для лечения или предупреждения нарушений или состояний, описанных в данном документе, или для применения в способах выявления, описанных в данном документе. Изделие содержит контейнер и метку. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылки, пузырьки, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть сформированы из ряда материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер может содержать композицию, описанную в данном документе для *in vivo* визуализации, и может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой мешок или пузырек для внутривенного раствора, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию иглой для подкожной инъекции). Активное средство в композиции представляет собой аднектин к PD-L1, описанный в данном документе. 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, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши в упаковке с инструкциями к применению.

В соответствии с определенными вариантами осуществления набор содержит один или несколько реактивов, необходимых для образования *in vivo* визуализирующего средства на основе меченого ^{18}F аднектина к PD-L1, такого как PD-L1 аднектин-PEG4-DBCO- ^{18}F , как дополнительно описано в данном документе. Например, набор может содержать первый пузырек, содержащий аднектин к PD-L1-PEG-4-DBCO, и второй пузырек, содержащий [^{18}F]FPPEGA. Набор может содержать первый пузырек, содержащий аднектин к PD-L1-PEG-4-DBCO, второй пузырек, содержащий 4-PEG-тозил-азид, и третий пузырек, содержащий ^{18}F в ^{18}O -воде. Наборы могут дополнительно содержать пузырьки, растворы и необязательно дополнительные реактивы, необходимые для получения PD-L1 аднектин-PEO4-OBDO- ^{18}F . Аналогично, наборы могут содержать реактивы, необходимые для образования меченого ^{64}Cu аднектина к PD-L1, как например, реактивы, описанные в данном документе.

Включение посредством ссылки

Все документы и источники, в том числе патентные документы и веб-сайты, описанные в данном

документе, отдельно включены в данный документ посредством ссылки в той мере, как если бы они были приведены в данном документе полностью или частично.

Настоящее изобретение теперь будет описано с учетом следующих примеров, которые являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Несмотря на то что настоящее изобретение было описано подробно и с учетом конкретных вариантов его осуществления, специалисту в данной области техники будет понятно, что в настоящем изобретении могут быть произведены различные изменения и модификации без отступления от его идеи и объема.

Примеры

Пример 1. Идентификация аднектинов, связывающихся с PD-L1

Аднектины к PD-L1 выделяли из библиотеки аднектинов, подвергнутой скринингу с использованием белка человеческого PD-L1, или обеспечивали их аффинное созревание с помощью технологии PROfusion из клонов, идентифицированных в библиотеке. Полноразмерные последовательности, коровые последовательности, последовательности BC, DE и FG петель этих аднектинов, а также варианты с модифицированным "PC" C-концом представлены на фиг. 1 и в табл. 3.

Например, высокоаффинный аднектин kPD-L1, ADX_5322_A02 ("A02"), получали посредством аффинного созревания аднектина ATI-964. Ген, кодирующий ATI-964, редиверсифицировали путем введения небольшой доли нуклеотидов, не характерных для дикого типа, в каждое нуклеотидное положение, которое кодирует остаток в BC, DE или FG петле. Полученную в результате библиотеку последовательностей аднектинов, родственных ATI-964, затем подвергали селекции *in vitro* с помощью PROfusion (мРНК дисплей) в отношении связывания с человеческим PD-L1 в условиях высокой жесткости. Клоны, подвергнутые обогащению после завершения селекции, секвенировали, экспрессировали в HTPP формате и подвергали скринингу в отношении их способности к связыванию с PD-L1 и в отношении их степени их мономерности. Клон с наилучшей комбинацией аффинности в отношении PD-L1 и устойчивых биофизических свойств подвергали мутации таким образом, чтобы он включал в себя C-концевой цистеин, вначале с использованием C-концевой последовательности NYRTPCH6 (форма, идентифицированная как ADX_5322_A02), а затем с использованием C-концевой последовательности NYRTPC.

Этому же процессу следовали для прошедшего аффинное созревание ATI-967, что приводило в результате к аднектину ADX_5417_E01. Аналогичным образом, прошедшие аффинное созревание ATI1760C02, ATI1760E01 ("E01") и ATI1760F01 получали с помощью аффинного созревания ATI1422G05.

Выделяли дополнительные аднектины к человеческому PD-L1. Их последовательности изложены в табл. 3.

Экспрессия и очистка аднектинов к PD-L1 с his-меткой

Все конструкторы ДНК содержали N-концевую his-метку, за которой следовала распознаваемая последовательность TVMV. Экспрессионные плазмиды (вектор pET-28 NM) для аднектинов к PD-L1, описанных выше, трансформировали в BL21(DE3) клетки (New England Biolabs). Клетки выращивали в среде Overnight Express Autoinduction media (Novagen) во встряхиваемых колбах объемом 1 л при 37°C в течение 6 ч с последующим выращиванием при 20°C в течение 16 ч при 220 об./мин. Клетки собирали с помощью центрифугирования и суспендировали в PBS, pH 7,2. Клетки лизировали механически, затем очищали с помощью центрифугирования. Растворимые фракции связывали посредством подачи самотеком на Ni-NTA агарозную смолу (Qiagen), промывали в смеси 20 mM Tris + 10 mM имидазол, pH 8,0, с последующим промыванием смесью 20 mM Tris + 40 mM имидазол, pH 8,0, и элюировали смесью 20 mM Tris + 400 mM имидазол, pH 8,0. В элюаты с никелем вводили TVMV-протеазу при 1:23-кратном молярном избытке аднектина. Смеси TVMV-элюат с аднектином подвергали диализу против 20 mM Tris, pH 8,0, при 4°C в течение 16 ч. Для разделения TVMV-протеазы и отщепленных фрагментов с his-меткой образцы загружали на 10 мл HisTrap FF колонку (GE Healthcare) и собирали проточные фракции.

Пример 2. Биофизическая оценка PD-L1 аднектинов

Оценивали свойства связывания ATI-1420D05, ATI-1420D05, ATI-1421E04 и ATI-1422G05, ATI_1760_C02, ATI_1760_E01 и ATI_1760_E01.

Таблица 1. Свойства связывания аднектинов к PD-L1

Название последовательности	SEQ ID	K _D (нМ)
ATI-1420B09		2,5
ATI-1420D05		9,5
ATI-1421E04		5,6

Свойства связывания очищенных аднектинов ATI-964, ATI-967, ATI-968, ADX_5322_A02 и ADX_5417_E01 с человеческим PD-L1 или PD-L1 яванского макака, которые определены с помощью метода Biacore, приведены в табл. 2. Связывание с клетками определяли посредством измерения связывания с положительными по человеческому PD-L1 L2987 клетками.

Таблица 2. Биофизические свойства аднектинов к PD-L1

Название последовательности	SEQ ID	Кинетические характеристики связывания				Температура середины перехода при плавлении (Tm)°C	EC ₅₀ связывания с клеткой
		k _a (1/М с)	k _d (с)	K _D (М)	K _D (М) для PD-L1 яванского макака		
ATI-964	30	3,6 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻¹⁰	1,4 x 10 ⁻¹⁰	н.д.	4,4
ATI-965	45	4,6 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁻⁴	7,1 x 10 ⁻¹⁰	8 x 10 ⁻¹⁰	н.д.	4,9
ATI-966	60	2,5 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁻⁵	2,8 x 10 ⁻¹¹	3,8 x 10 ⁻¹¹	н.д.	2,3
ATI-967	75	2,1 x 10 ⁶	6,7 x 10 ⁻⁵	3,2 x 10 ⁻¹¹	6 x 10 ⁻¹¹	н.д.	н.д.
ATI-968	15	7,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻¹⁰	1,1 x 10 ⁻¹⁰	60	3,4
ADX_5322_A02	91	2,5 x 10 ⁶	5,7 x 10 ⁻⁴	2,28 x 10 ⁻¹⁰	н.д.	82	0,43 нМ (с прикрепленной к Cys группой)
ADX_5417_E01	107	2,0 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻¹¹	н.д.	73	н.д.

Данные связывания указывают на то, что подвергшиеся аффинному созреванию аднектины к человеческому PD-L1 связываются с человеческим PD-L1 с аффинностями, которые составляют менее 1 нМ или даже менее 0,1 нМ. Иллюстративные кривые ингибирования показаны на фиг. 12.

Аднектины к PD-L1 имеют следующие дополнительные характеристики:

ингибирование связывания человеческого PD-1 с человеческим PD-L1, которое определено посредством измерения ингибирования связывания человеческого PD-1Fc с положительными по PD-L1 L2987 клетками с помощью проточной цитометрии и показано, например, для аднектинов ATI-964, ATI-965, ATI-966, ATI-967, ATI-968, A02 и E01;

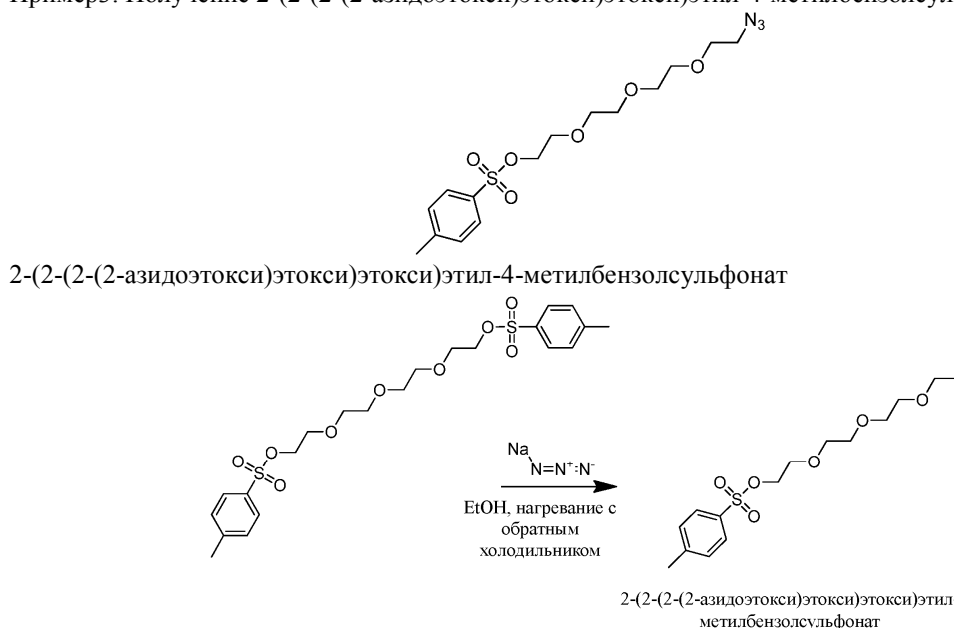
ингибирование связывания человеческого CD80 (B7-1) с человеческим PD-L1, которое определено с помощью метода ELISA. Например, ATI-964 ингибирует связывание с EC₅₀, составляющей 41 пМ; ATI-965 ингибирует связывание с EC₅₀, составляющей 210 пМ; ATI-966 ингибирует связывание с EC₅₀, составляющей 28 пМ; и ATI-968 ингибирует связывание с EC₅₀, составляющей 56 пМ;

ингибирование связывания антитела к PD-L1 12A4 с человеческим PD-L1, которое определено с помощью метода ELISA.

Антитела к PD-L1 также исследовали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR): ATI-964, ATI-965 и ATI-968 были активными в MLR, тогда как ATI-966 и ATI-967 не были активными в MLR.

Следующие примеры относятся к мечению аднектинов к PD-L1 ¹⁸F и ⁶⁴Cu.

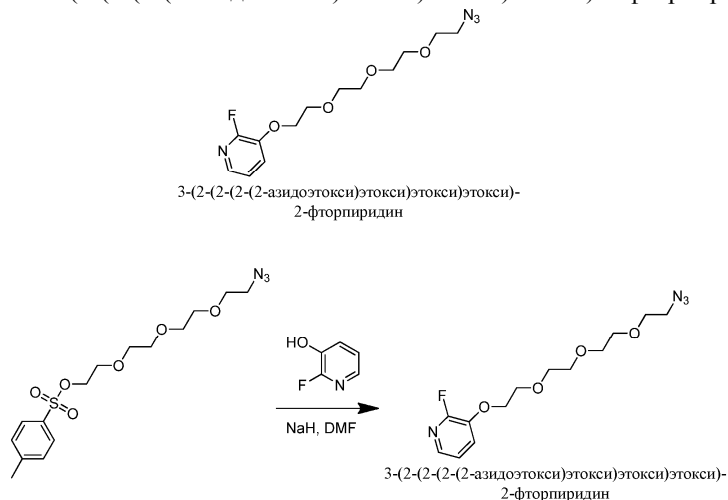
Пример 3. Получение 2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил-4-метилбензолсульфоната



Смесь ((оксибис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(4-метилбензолсульфоната) (5 г, 9,95 ммоль) и азид натрия (0,647 г, 9,95 ммоль) растворяли в этаноле (50 мл) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником до 90°C в течение 17-часового периода. Растворитель удаляли с использованием частичного вакуума, а затем загружали на картридж с 40 г диоксида кремния и очищали с использованием флэш-хроматографии (IscoCombiFlash - элюировали с использованием метода линейно-

го градиента, начиная с 10% этилацетата в гексанах и переходя к 90% этилацетата в гексанах в течение 45-минутного периода). Собранные вместе фракции проверяли с помощью TLC и объединяли с получением 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната в виде бесцветного масла. Вследствие реакционной способности продукта в виде 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната этот материал использовали "как есть" без какой-либо дополнительной характеристики.

Пример 4. Получение 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина



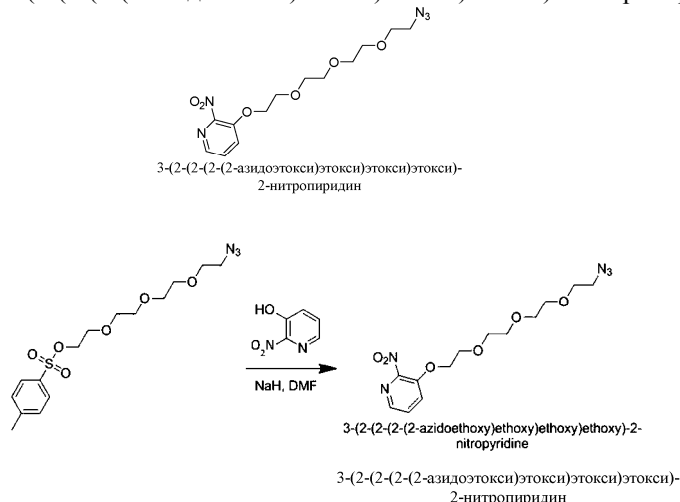
К суспензии гидрида натрия (0,129 г, 3,21 ммоль) в DMF (10 мл) при 0°C по каплям добавляли перемешиваемый раствор 2-фторпиридин-3-ола (0,363 г, 3,21 ммоль) в DMF (5 мл), за этим следовало добавление по каплям раствора 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (1,00 г, 2,68 ммоль) в DMF (5 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до температуры окружающей среды в течение 1 ч с последующим дополнительным нагреванием до 60°C в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Добавляли 100 мл этилацетата с последующими 3 отдельными процедурами экстрагирования промыванием с использованием концентрированного солевого раствора. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали с использованием флэш-хроматографии (IscoCombiFlash -элюирование 10-50% EtOAc в Hex) с получением бесцветного масла. 3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин (702 мг, 2,233 ммоль, выход 83%) выделяли в виде прозрачного масла.

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,75 (dt, J=4,9, 1,6 Гц, 1H), 7,33 (ddd, J=10,0, 8,1, 1,5 Гц, 1H), 7,10 (ddd, J=7,9, 4,9, 0,7 Гц, 1H), 4,30-4,16 (m, 2H), 3,95-3,83 (m, 2H), 3,80-3,61 (m, 10H), 3,38 (t, J=5,1 Гц, 2H)

¹³C ЯМР (101 МГц, хлороформ-d) δ 142,3, 137,7, 137,5, 123,4, 123,4, 121,7, 121,6, 77,3, 76,7, 70,9, 70,7, 70,6, 70,0, 69,4, 69,0, 50,6

¹⁹F ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ -83,55. HRMS (ESI) теоретическое: C₁₃H₂₀FN₄O₄ +m/z 315,464; обнаруженное: 315,1463.

Пример 5. Получение 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина



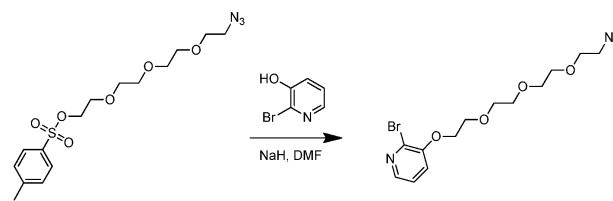
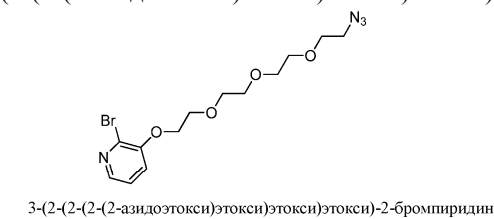
Гидрид натрия (0,121 г, 3,01 ммоль) (60% суспензия в масле) растворяли в DMF (7,0 мл) и полученную в результате суспензию охлаждали до 0°C. Медленно добавляли раствор 2-нитропиридин-3-ола (0,384 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл) с последующим добавлением по каплям 2-(2-(2-(2-

азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этил-4-метилбензолсульфоната (1,023 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до температуры окружающей среды в течение 1 ч с последующим нагреванием до 60°C в течение 72-часового периода. Реакцию гасили 10 мл DI (деионизированной) воды с последующим экстрагированием этилацетатом (3×10 мл). Собранные экстракты в EtOAc промывали концентрированным соевым раствором (10 мл), сушили над сульфатом магния, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением светло-желтого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии. Картридж с 24 г диоксида кремния, 25 мл/мин., начиная с 10% этилацетата в гексанах, с последующим линейным изменением до 50% этилацетата в гексанах в течение 25-минутного периода. После этого периода градиент поддерживали при этом составе растворителя в течение 10 мин, затем изменяли до 100% этилацетата в течение 10-минутного периода. 3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-2-нитропиридин элюировали в период между 30 и 40 мин на хроматограмме и объединенные фракции выпаривали при пониженном давлении, затем в вакууме в течение 2 ч с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-2-нитропиридина (687 мг, 1,973 ммоль, выход 72,0%) в виде светло-желтого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,11 (dt, J=4,9, 1,6 Гц, 1H), 7,60 (ddd, J=10,0, 8,1, 1,5 Гц, 1H), 7,52 (ddd, J=7,9, 4,9, 0,7 Гц, 1H), 4,30 - 4,16 (m, 2H), 3,95-3,83 (m, 2H), 3,80-3,61 (m, 10H), 3,38 (t, J=5,1 Гц, 2H)

¹³C ЯМР (101 МГц, хлороформ-d) δ 147,3, 139,5, 128,4, 124,4, 71,1, 70,7, 70,6, 70,0, 69,9, 69,3, 50,7.
HRMS (ESI) Теоретическое: C₁₃H₂₀N₅O₆⁺ m/z 342,1408; обнаруженное: 342,1409

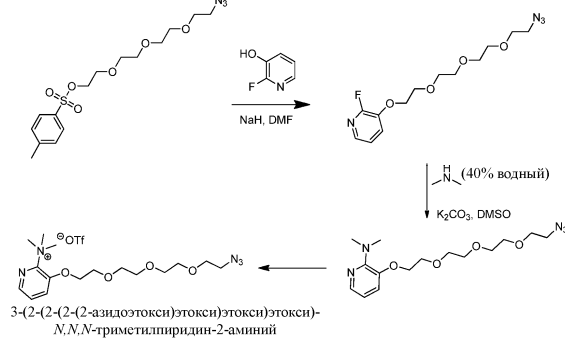
Пример 6. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина



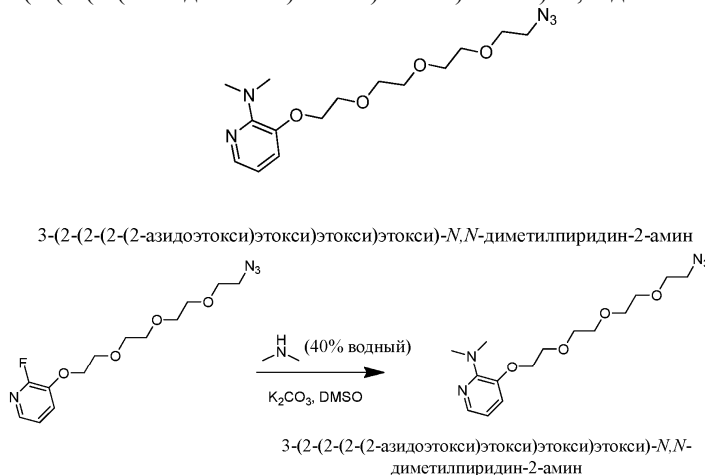
К суспензии гидроксида натрия (NaH, 25,7 мг, 0,643 ммоль) в диметилформамиде (DMF, 5 мл) при 0°C по каплям добавляли раствор 2-бромпиридин-3-ола (112 мг, 0,643 ммоль) в DMF (1 мл), за этим следовало добавление по каплям раствора 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (200 мг, 0,536 ммоль) в DMF (1 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до температуры окружающей среды и выдерживали в течение 1 ч с последующим нагреванием до 60°C в течение 4 ч. По завершении нагревания растворитель из неочищенной реакционной смеси удаляли в вакууме. Неочищенную реакционную смесь повторно растворяли в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного солевого раствора и органический слой высушивали над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенную реакционную смесь очищали с использованием обращенно-фазовой HPLC с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина, TFA (112 мг, 0,229 ммоль, выход 42,7%) в виде светло-желтого масла. HRMS ESI m/z (M+H), Теоретическое $C_{13}H_{20}BrN_4O_4$ 375,0664; обнаруженное: 375,0662;

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7.97 (dd, J=4,6, 1,5 Гц, 1H), 7.54 (dd, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 7.40 (dd, J=8,1, 4,6 Гц, 1H), 4.24 (dd, J=5,3, 3,9 Гц, 2H), 3.85 - 3.78 (m, 2H), 3.68-3.62 (m, 2H), 3.62-3.52 (m, 8H), 3.42-3.34 (m, 2H).

Пример 7. Схема для синтеза триметиланилиевого соединения



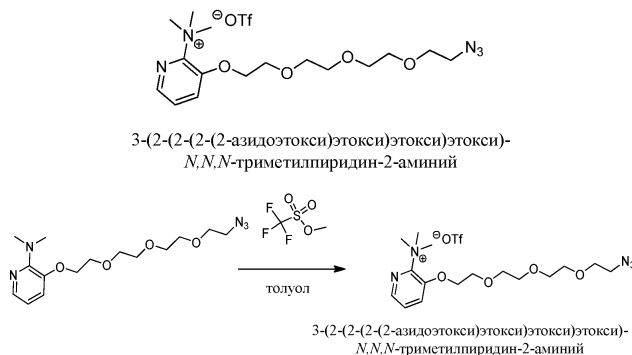
Пример 8. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-N,N-диметилпиридин-2-амина



Смесь 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-2-фторпиридина (160 мг, 0,509 ммоль), карбоната кальция (K_2CO_3 , 84 мг, 0,611 ммоль) и диметиламина (40% в воде, 0,097 мл, 0,764 ммоль) в диметилсульфоксиде (DMSO, 2,5 мл) нагревали в запечатанном герметичном сосуде до $110^\circ C$ в течение 14 ч. По завершении нагревания растворитель из неочищенной реакционной смеси удаляли в вакууме. Неочищенную реакционную смесь повторно растворяли в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного солевого раствора и органический слой высушивали над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенную реакционную смесь очищали с использованием нормально-фазовой хроматографии с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-N,N-диметилпиридин-2-амина (140 мг, 0,413 ммоль, выход 81%) в виде бесцветного масла.

1H ЯМР (400 МГц, хлороформ- d) δ 7,86 (dd, $J=4,9$, 1,5 Гц, 1H), 7,02 (dd, $J=7,8$, 1,5 Гц, 1H), 6,73 (dd, $J=7,8$, 4,9 Гц, 1H), 4,20-4,07 (m, 2H), 3,98-3,86 (m, 2H), 3,81 - 3,61 (m, 9H), 3,38 (t, $J=5,1$ Гц, 2H), 3,13-2,94 (m, 6H), 1,69 (s, 2H). HRMS (ESI) Теоретическое: $C_{15}H_{26}N_5O_4^+$ m/z 340,1980; обнаруженное: 340, 1979.

Пример 9. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия

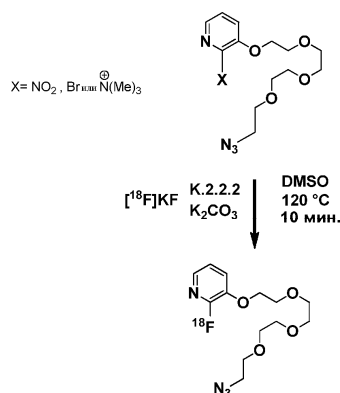


Метилтрифторметансульфонат (0,065 мл, 0,589 ммоль) добавляли к раствору 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-N,N-диметилпиридин-2-амина (40 мг, 0,118 ммоль) в толуоле (1,5 мл) в запечатанном контейнере в стационарном потоке азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14-часового периода. Растворитель удаляли и полученный в результате остаток промывали 2×10 мл эфира, подвергали азеотропной сушке с 2×1 мл дихлорметана и высушивали в высоком вакууме в течение ночи с получением трифторметансульфонатной соли 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия с количественным выходом в ви-

де вязкого бесцветного масла. LCMS m/z 354,33;

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 8,24-8,17 (m, 1H), 7,98 (d, J=8,3 Гц, 1H), 7,75 (ddd, J=8,2, 4,6, 3,2 Гц, 1H), 4,44 (br. s., 2H), 3,88 (d, J=3,9 Гц, 2H), 3,69-3,45 (m, 21H).

Пример 10. Синтез ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина с использованием трифторметансульфонатной соли 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия



Синтез ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина

Водный раствор ^{18}F -фторида (2,0 мл, 33,3 ГБк/ 900 мКи) приобрели у P.E.T. Net® Pharmaceuticals в Вест Пойнт, Пенсильвания, и переносили непосредственно в картридж Sep-Pak light QMA [картридж Sep-Pak light QMA подвергали последовательному предварительному кондиционированию с использованием 5 мл 0,5 М бикарбоната натрия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл MeCN перед применением]. По завершению этого переноса водный ^{18}F фторид высвобождали из QMA Sep-Pak посредством последовательного добавления карбоната калия (15 мг/мл; 0,1 мл) с последующим добавлением смеси карбоната калия (30 мг/мл, 0,1 мл), 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана (15 мг, 0,04 ммоль) и 1,2 мл MeCN. Растворитель выпаривали в слабом потоке азота при 90°C и в вакууме. Азеотропную сушку повторяли дважды с использованием 1 мл порций ацетонитрила с образованием безводного комплекса K.2.2.2/ ^{18}F F. Трифторметансульфонатную соль 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)N,N,N-триметилпиридин-2-аминия (2 мг, 5,6 мкмоль) растворяли в 500 мкл DMSO и добавляли к высушенному криптану. Этот раствор нагревали до 120°C в течение 10 мин. По завершении этого периода неочищенную реакционную смесь разбавляли 3 мл DI воды. Все содержимое неочищенной реакционной смеси затем переносили, загружали и очищали с применением обращенно-фазовой HPLC в следующих условиях: Колонка для HPLC: Luna C18 250×10; растворитель A: 0,1% TFA в DI воде; растворитель B: 0,1% TFA в ацетонитриле при скорости потока 4,6 мл/мин с использованием изократического метода до 32% B, в то время как сигнал в виде УФ-излучения отслеживали при длине волны 280 нм. ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин выделяли во фракции, соответствующей 24-минутной отметке на хроматограмме, и собирали в течение 2-минутного периода. Этот продукт собирали в 100 мл колбу, которая содержала 10 мл DI воды, и все содержимое доставляли в картридж Sep-Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack от Waters. 6,1 ГБк/164 мКи ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина выделяли из этой реакционной смеси. Его высвобождали из картриджа sep-pak с использованием 3 мл этанола и объем этого раствора сокращали с использованием источника тепла температурой 98°C, слабого потока азота и вакуума в течение 15-минутного периода до тех пор, пока в пузырьке оставалась только пленка. Конечный продукт повторно растворяли в 100% 1x PBS буфере, и он был стабилен в этой среде в течение более 1 ч при 37°C.

^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин можно использовать для получения меченых ^{18}F биологических продуктов (например, меченых ^{18}F аднектинов к PD-L1, которые описаны ниже), пользуясь преимуществом "клик"-реакции азид-алкин с соответствующим биологическим продуктом, содержащим алкины.

Пример 11. Получение меченого радиоактивным изотопом ^{18}F белка с использованием "клик-химии"

А. Фторирование 4-PEG-тозил-азидного предшественника с образованием ^{18}F -FPPEGA

^{18}F с активностью 900 мКи в ^{18}O -воде (3 мл) (приобретен у IBA Molecular) переносили непосредственно в микрофлакон (без QMA), который содержал 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозан (2,8 мг, 7,44 мкмоль) и карбонат калия (1,7 мг, 0,012 ммоль). Дополнительные 2,0 мл ацетонитрила переносили в эту неочищенную реакционную смесь и всю смесь подвергали азеотропной сушке. Ее завершали выпариванием раствора с использованием масляной бани температурой 98°C и при применении слабого потока N_2 и частичного вакуума. Объем раствора сокращался приблизительно до 2 мл. Добавляли дополнительные 2 мл ацетонитрила и процесс повторяли 3 раза в течение 40-минутного периода. Когда объем жидкости сокращался до менее чем 0,3 мл, добавляли аликвоту

ацетонитрила объемом 0,7 мл и объем раствора сокращали посредством азеотропной дистилляции до тех пор, пока объем не составлял ~ 0,1 мл. Добавляли дополнительные 0,9 мл ацетонитрила и этот процесс завершали, когда образовывалось белое твердое вещество. Этот процесс занимал ~ 55 мин. В ходе окончательной процедуры флакон удаляли из масляной бани до того, как раствор полностью высыхал, и остаток во флаконе помещали в полный вакуум (без потока N₂) при комнатной температуре на 20 мин. Суммарное время для переноса и высушивания смеси с криптаном [¹⁸F]-FPPEGA составляло 65 мин.

К высушенной смеси с криптаном [¹⁸F]-FPPEGA добавляли 3-(2-(2-(2-азидоэтоксидокси)этоксидокси)этоксидокси)-2-нитропиридин (2 мг, 5,86 мкмоль), растворенный в 500 мкл DMSO, и эту смесь нагревали до 120°C в течение 10 мин. После этого периода времени неочищенную реакционную смесь разводили 3 мл DI воды и все содержимое затем переносили и загружали на следующую колонку для FIPLC и при следующих условиях: Колонка для FIPLC: Luna C18 250×10 мм; растворитель A: 0,1% TFA в DI воде; растворитель B: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 4,6 мл/мин; давление 1820 фунт/кв. дюйм; изократический метод до 32% B; выявление в УФ при длине волны 280 нм. Продукт в виде [¹⁸F]-3-(2-(2-(2-азидоэтоксидокси)этоксидокси)этоксидокси)-2-фторпиридином ([¹⁸F]-FPPEGA) выделяли во фракции, соответствующей 24-минутной отметке на хроматограмме, и собирали в течение 2-минутного периода. Этот продукт собирали в 100 мл колбу, которая содержала 15 мл DI воды, и все содержимое доставляли в картридж Sep Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack. PN WAT036795. [¹⁸F]-FPPEGA высвобождали из картриджа Sep Pak с использованием 2,5 мл этанола и объем этого раствора сокращали с использованием N₂ температурой 98°C и воздействия вакуума в течение 15-минутного периода до высыхания. Это соединение растворяли в 0,1 мл 1 X PBS (фосфатно-солевой буферный раствор). Этот продукт анализировали с использованием FIPLC хроматографа Varian с колонкой для HPLC Luna C18 (2) 4,6×150 мм; Растворитель A: 0,1% TFA в DI воде; растворитель B: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 1,0 мл/мин.; метод создания градиента: 0 мин 90% A 10% B; 15 мин 30% A 70% B; 17 мин 30% A 70% B; 18 мин 90% A 10% B; 20 мин 90% A 10% B; выявление в УФ при длине волны 280 нм. Выделяли 220 мКи [¹⁸F]-FPPEGA.

В. Получение E01-4PEG-DBCO

В этом примере описывается связывание аднектина к PD-L1 E01 с PEG4-DBCO.

Поскольку химическое средство на основе малеимида используется для связывания аднектина с PEG4-DBCO, аднектин E01 вначале модифицировали посредством добавления пролина, за которым следовал цистеин, к его С-концу. Аминокислотная последовательность этого модифицированного аднектина E01 представлена в SEQ ID NO: 104. Цистеин используется для связывания аднектина с PEG4-DBCO.

Малеимид-PEG4-DBCO (Click Chemistry Tools) в 4-кратном молярном избытке растворяли в DMSO и добавляли к очищенному модифицированному аднектину E01 в присутствии 1 mM TCEP. Конечные концентрации DMSO не превышали 5% в смесях, где проходила конъюгация. Смесь, в которой проходила конъюгация, оставляли при комнатной температуре на один час до проведения масс-спектрометрического анализа. После подтверждения конъюгации с использованием MS образец очищали с помощью гель-хроматографии с использованием колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенной в PBS, pH 7,2.

С. Связывание [¹⁸F]-FPPEGA с аднектином

Схематическое изображение синтеза [¹⁸F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA показано на фиг. 2 и 9. 0,2 мл раствора аднектина E01-4PEG-DBCO (полученного, как описано в разделе В) в концентрации 5,4 мг/мл инкубировали с 0,1 мл [¹⁸F]-FPPEGA (пример 4) с активностью 200 мКи в 1 × PBS буфере. Раствор осторожно перемешивали, набирая неочищенную реакционную смесь в пипетку и выпуская ее из пипетки несколько раз, и инкубировали вместе в течение 45 мин при 45°C или комнатной температуре. Содержимое неочищенной реакционной смеси очищали с использованием колонки для SEC. Superdex 200, 0,5 мл/мин., 1 X PBS буфер, и продукт в виде [¹⁸F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA выделяли во фракции, соответствующей 37-минутной отметке на хроматограмме, в течение 2-минутного периода.

[¹⁸F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA анализировали посредством SEC с совместным впрыскиванием не-радиоактивного стандарта, RP FIPLC с использованием PLRPS колонки и гель-электрофореза.

Гель-хроматографию (SEC) проводили с использованием следующих параметров:

Колонка Superdex 200; растворитель 100% 1X PBS буфер; скорость потока 0,5 мл/мин., 280 UV;

Обращенно-фазовая FIPLC

Колонка: PLRPS 8 мкм 1000 A 4,6×250 мм

Растворитель A: 0,1% муравьиная кислота в DI воде

Растворитель B: ацетонитрил

Скорость потока: 1 мл/мин.

Давление: 1351 фунт/кв. дюйм

Градиент:

0 мин 90% A 10% B

30 мин 45 %A 55% B

32 мин 25% A 75% B

36 мин 25% А 75% В

50 мин 90% А 10% В

15 мКи [^{18}F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA выделяли со степенью радиохимической чистоты (RCP), составляющей > 99% по расчетам с использованием как SEC, так и RP HPLC, и со специфической активностью, составляющей 0,6 мКи/нмоль, когда реакцию проводили при 45°C. При проведении реакции при комнатной температуре получали 5,72 мКи. Специфическая активность [^{18}F]-FPPEGA составляла 0,512 мКи/нмоль, и RCP составляла 85,7% через 3 ч после окончания его синтеза при проведении реакции при 45°C или при комнатной температуре соответственно. Специфическую активность измеряли посредством Nanodrop (см. www.nanodrop.com). Продукт элюировался совместно с нерадиоактивным стандартом как в SEC, так и PLRPS. Гель-электрофорез подтверждал соответствие ^{18}F продукта стандарту молекулярной массы 11 кДа.

Меченый радиоактивным изотопом ^{18}F E01-4PEG-DBCO можно использовать в ряде применений в *in vitro* и/или *in vivo* визуализации, в том числе в диагностической визуализации, фундаментальных исследованиях и радиотерапевтических применениях. Конкретные примеры возможных применений в диагностической визуализации и радиотерапевтических применениях включают в себя определение положения, относительной активности положительных по PD-L1 опухолей и/или их количественную оценку, радиоиммунологический анализ положительных по PD-L1 опухолей и автордиографию для определения распространения положительных по PD-L1 опухолей у млекопитающего или в образце из его органа или ткани.

В частности, меченый радиоактивным изотопом ^{18}F E01-4PEG-DBCO является подходящим для визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) положительных по PD-L1 опухолей в легком, сердце, почках, печени и коже, а также других органах людей и экспериментальных животных. Визуализацию с помощью PET с использованием меченого радиоактивным изотопом ^{18}F E01-4PEG-DBCO можно применять для получения следующей информации: взаимосвязь между уровнем заполнения ткани лекарственными препаратами-кандидатами для лечения опухоли, экспрессирующей PD-L1, и клинической эффективностью у пациентов; выбор дозы для клинических испытаний лекарственных препаратов для лечения опухоли, экспрессирующей PD-L1, перед началом долгосрочных клинических исследований; сравнение эффективности структурно новых лекарственных препаратов для лечения опухоли, экспрессирующей PD-L1; изучение влияния лекарственных препаратов для лечения опухоли, экспрессирующей PD-L1, на аффинность к транспортерам *in vivo* и плотность в ходе лечения клинических мишеней лекарственными препаратами для лечения опухоли, экспрессирующей PD-L1; изменение плотности и распространения положительных по PD-L1 опухолей в ходе эффективного и неэффективного лечения.

Пример 12. Связывание PD-L1 аднектинов с NODAGA для получения NODAGA-PD-L1 аднектинов

В этом примере описывается связывание аднектинов к PD-L1 E01 и A02 с NODAGA. Поскольку химическое средство на основе малеимида используется для связывания аднектинов с NODAGA, в обоих аднектинах использовался пролин, за которым следовал цистеин, на их С-конце (как описано для E01 выше). Аминокислотные последовательности модифицированных аднектинов E01 и A02 представлены в SEQ ID NO: 104 и 88, соответственно. Цистеин будет использоваться для связывания аднектинов с NODAGA. В случае мечения аднектинов ^{64}Cu 50-кратный молярный избыток малеимид-NODAGA (ChEMatech) растворяли в PBS, pH 7,4 и добавляли к очищенным аднектинам в присутствии 1 мМ TCEP. Конечные концентрации DMSO не превышали 5% в смесях, где проходила конъюгация. Смеси, в которых проходила конъюгация, оставляли при комнатной температуре на один час до проведения масс-спектрометрического анализа. После подтверждения конъюгации с использованием MS образцы очищали с помощью гель-хроматографии с использованием колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенной в PBS, pH 7,2.

Пример 13. Синтез зондов на основе ^{64}Cu аднектина к PD-L1

Синтез ^{64}Cu -A02-NODAGA

[^{64}Cu]-хлорид меди ($^{64}\text{CuCl}_2$) в 0,1 н раствор соляной кислоты нейтрализовали с использованием 0,8 мл 0,1 н водного раствора ацетата натрия (NaOAc) в течение 4 мин при температуре окружающей среды. 1 мл раствора ^{64}Cu /NaOAc добавляли к A02-NODAGA (30 мкл в концентрации 1,6 мг/мл) и неочищенную реакционную смесь осторожно пипетировали, чтобы обеспечить смешивание, а затем оставляли отстояться при комнатной температуре на 30 мин. Содержимое неочищенной реакционной смеси перенесли в обессоливающую колонку PD-10, которую предварительно активировали с использованием 20 мл 1х фосфатно-буферного солевого раствора (PBS, pH 7,4) перед загрузкой образца. Дополнительные 1,5 мл 1х PBS добавляли в колонку с последующим добавлением дополнительных 0,8 мл 1х раствора PBS и эти фракции сливали. [^{64}Cu]-A02-NODAGA затем собирали после 1,2 мл элюирования PD-10 колонки с получением 10,79 мКи в виде желаемого продукта. Контроль качества выполняли с помощью системы для обращенно-фазовой HPLC с использованием колонки для HPLC Agilent PLRP-S с размером: 250×4,60 мм, 8 мкм, выявлением при 280 нм и подвижной фазой из 0,1% муравьиной кислоты в дистиллированной воде и ацетонитриле. Метод создания градиента использовали в случае, когда процент аце-

тонитрила повышали линейно от 10 до 45% в течение 30-минутного временного интервала. [^{64}Cu]-A02-NODAGA элюировался совместно с эталонным стандартом во фракции, соответствующей 22-минутной отметке на HPLC хроматограмме. Измеренная радиохимическая чистота составляла 96% при использовании этого метода. [^{64}Cu]-A02-NODAGA также элюировался совместно с эталонным материалом во фракции, соответствующей 20-минутной отметке при использовании гель-хроматографии (SEC), колонка: GE Superdex 200 GL Размер: 10×300 мм, выявление при 280 нм. Рассчитанная специфическая активность составляла 956,8 мКи/мкмоль, исходя из концентрации белка, определенной методом Nanodrop, и выделенной радиоактивности у очищенного образца.

Процедура для синтеза ^{64}Cu -E01-NODAGA

[^{64}Cu]-хлорид меди ($[\text{Cu}^{64}\text{CuCl}_2]$) в 0,1 н растворе соляной кислоты (20 мКи в 0,25 мл) подвергали коррекции pH с использованием 1,10 мл 0,1 н аммоний-ацетатного буфера, затем смешивали и инкубировали с аднектин E01-NODAGA в водном растворе 1X PBS (40 мкл в концентрации 1,2 мг/мл, 4,62 нмоль) в течение 30 мин при температуре окружающей среды. После 30 мин инкубирования реакционную смесь (~ 1250 мкл) переносили в обессоливающую колонку PD-10 (GE Healthcare Life Science, среда Sephadex G25, 14,5×50 мм - с выравниванием 40 мл 1X PBS) и обеспечивали возможность попадания образца в колонку в полном объеме под действием силы тяжести, и за этим следовало добавление 1,1 мл 1X PBS. После того как жидкость полностью проходила через колонку, продукт собирали посредством элюирования с 1 мл приращением при использовании 1X PBS во флакон с образцом. ^{64}Cu -E01-NODAGA выделяли во второй 1 мл фракции, и по результатам измерений его активность составляла 9,26 мКи в 1 мл 1X PBS. Этот образец анализировали с помощью метода аналитической гель-хроматографии с HPLC при использовании системы для HPLC Agilent, оснащенной детектором для выявления в ультрафиолетовой и видимой области спектра (UV/vis) ($\lambda = 280$ нм), детектором posi-ram и колонкой для гель-хроматографии Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Science, размер пор 13 мкм). Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, и водная подвижная фаза была изократичной с 1X PBS с 0,02% NaN_3 в течение 60 мин. Радиохимическая чистота составляла 99% при использовании этой системы, и продукт элюировался совместно с нерадиоактивным эталонным стандартом. Специфическую активность рассчитывали на основании уравнения 3-точечной калибровочной кривой ($y = 656978x$). Приблизительно 100 мкл раствора с продуктом из флакона 3 впрыскивали на гель-хроматографическую колонку Superdex-200. Продукт, соответствующий пику, собирали, и измеренная активность составляла 0,74 мКи, количество импульсов счета УФ-сигнала для пика, соответствующего продукту, составляло 156367 единиц, а специфическая активность составляла 3,1 мКи/нмоль.

Пример 14. Установление различий *in vitro* между положительными по PD-L1 клетками и отрицательными по PD-L1 клетками с использованием визуализирующего средства основе аднектина к PD-L1

В этом эксперименте ^{64}Cu -E01 аднектин к PD-L1 (NODAGA использовали в качестве хелатора) исследовали в отношении его способности определения различий между положительными по hPD-L1 клетками и отрицательными по hPD-L1 клетками *in vitro*. Мечение клеток было специфическим, о чем свидетельствовала отличающаяся ассоциация ^{64}Cu -E01 с положительными по hPD-L1 L2987 клетками по сравнению с отрицательными по hPD-L1 HT-29 клетками (ассоциированная с клетками радиоактивность была в 44,6 раза выше у положительных по hPD-L1 L2987 клеток). Специфичность дополнительно подтверждалась выраженным снижением уровня ассоциированного с клеткой ^{64}Cu -E01 при совместном инкубировании с 450 нМ избытком "холодного" (немеченого) E01 аднектина (снижение на 99,6%). Уровень ассоциированного с клетками ^{18}F -E01 снижался минимально (снижение на 9,9%, не значимо) в случае, когда клетки инкубировали совместно с 450 нМ "холодного" (немеченого) аднектина, не связывающегося с PD-L1 (фиг. 3).

1×10^6 положительных по hPD-L1 L2987 клеток карциномы легкого человека или отрицательных по hPD-L1 HT-29 клеток аденокарциномы толстой и прямой кишки человека помещали в 5 мл пробирки для культур ($n=3$ пробирки на условие). Раствор ^{64}Cu -E01 аднектина готовили в смеси PBS + 0,5% BSA в концентрации 300 нКи/200 мкл. Порции этого раствора дополняли либо "холодным" (немеченым) E01 аднектином или "холодным" (немеченым) аднектином, не связывающимся с PD-L1, до конечной концентрации 450 нМ. Образцы с клетками центрифугировали в течение 5 мин при 200×g, а затем ресуспендировали в 200 мкл соответствующего раствора ^{64}Cu -E01 аднектина и инкубировали на льду в течение 1 ч. После периода инкубирования образцы с клетками центрифугировали при 200×g и супернатант сливали. Клеточные осадки ресуспендировали в 1 мл смеси PBS + 0,5% BSA и процедуру отмывки повторяли в общей сложности 3 раза. После окончательной отмывки клетки снова центрифугировали при 200×g и супернатант сливали. Радиоактивность оставшихся клеточных осадков затем измеряли с помощью счетчика гамма-частиц.

В своей совокупности эти результаты демонстрируют способность ^{64}Cu -E01 аднектина устанавливать различие между PD-L1(+) и PD-L1(-) клетками *in vitro*. Специфичность дополнительно демонстрировалась выраженным снижением уровня ассоциированного с клетками радиоактивного маркера в образцах, подвергавшихся совместному инкубированию с 450 нМ немеченого аднектина к PD-L1 E01 (и только статистически не значимое снижение при совместном инкубировании с 450 нМ аднектина, не связывающегося с PD-L1).

вающегося с PD-L1). Подобные эксперименты проводили с применением разных вариантов аднектинов, а также с ^{18}F в качестве радионуклида с аналогичными результатами.

Пример 15. Установление различий между положительными по PD-L1 опухолями и отрицательными по PD-L1 опухолями с использованием визуализирующего средства на основе аднектина к PD-L1

В случае визуализации с помощью PET высокие скорости выведения из крови обеспечивают преимущество по сравнению с более медленно выводимыми белками, такими как антитела, сводя к минимуму промежуток времени, необходимый для уменьшения "фоновых" сигналов от зонда из нерелевантной ткани. В клинических условиях длительный период полувыведения PET маркеров на основе антител может требовать нескольких суток ожидания после инъекции до тех пор, пока можно будет получить изображения. Быстро выводящиеся зонды делают возможным получение высококонтрастных изображений, которые можно получить в тот же день, когда вводят инъекцией зонд, и что очень важно, они также могут служить для снижения общего воздействия радиации на исследуемых животных или оцениваемых пациентов.

В этом эксперименте ^{64}Cu -A01 аднектин к PD-L1 (NODAGA использовали в качестве хелатора), полученный, как описано в вышеизложенных примерах, исследовали в отношении его способности определения различий между положительными по hPD-L1 опухолями и отрицательными по hPD-L1 опухолями у мышей.

Мышей, несущих двусторонние ксенотрансплантаты опухолей, получали посредством введения 1×10^6 hPD-L1(+) L2987 клеток карциномы легкого человека и $1,5 \times 10^6$ hPD-L1(-) HT-29 клеток карциномы ободочной кишки человека подкожно в противоположные бока мыши. После того как опухоли достигали примерно 300 мм^3 (примерно 2-3 недели после имплантации клеток), выбирали животных для визуализации. Для визуализации животные получали анестезию с использованием 2% изофлурана, и в хвостовую вену устанавливали катетеры. Мышей затем помещали в сделанный по индивидуальному заказу держатель для животных емкостью 4 животных, где они оставались под анестезией в ходе исследования. Держатель для животных переносили в сканер microPET® F120™ (Siemens Preclinical Solutions, Ноксвилл, Теннесси). Аксиальное поле зрения у этого инструмента составляло 7,6 см. В связи с этим ограничением животных располагали таким образом, чтобы сканируемый участок находился в промежутке от области, находящейся непосредственно перед глазами животного, примерно до основания его хвоста.

Вначале получали изображение в проходящих лучах, воздействующих в течение 10 минут, с использованием точечного источника ^{57}Co с целью коррекции затухания у окончательных PET изображений. После сканирования в проходящих лучах растворы радиоактивного маркера вводили через ранее установленные катетеры в хвостовой вене и получали 2-часовое эмиссионное изображение. Введенные инъекцией растворы радиоактивного маркера состояли либо из примерно 200 мкКи ^{64}Cu -A02 (с хелатором NODAGA), либо из 200 мкКи ^{64}Cu -A02, дополненного "холодным" немеченым аднектином A02 в конечной концентрации 3 мг/кг (на основе веса отдельного животного). Все вводимые инъекцией растворы составляли в 200 мкл солевого раствора перед инъекцией. Точные введенные инъекцией дозы рассчитывали посредством проведения непосредственных измерений составленной дозы и вычитания радиоактивности, оставшейся в шприце и катетере в хвостовой вене.

Изображения реконструировали с использованием алгоритма оценки с помощью апостериорного максимума (MAP) с коррекцией затухания при использовании полученных изображений в проходящих лучах и скорректированное с учетом распада радиоактивного изотопа. В окончательных изображениях представляющие интерес участки (ROI) очерчивали вокруг границ опухолей с использованием программного обеспечения ASIPro (Siemens Preclinical Solutions). Кривые зависимости активности от времени рассчитывали для каждого ROI с получением количественного представления присутствия радиоактивного маркера в объеме опухоли в ходе получения 2-часового эмиссионного изображения. Для окончательного сравнения отдельные кривые зависимости активности от времени нормализовали, исходя из дозы введенного инъекцией радиоактивного маркера для каждого конкретного животного. Поглощение радиоактивного маркера сравнивали у опухолей при использовании конечного 10-минутного отрезка на каждой кривой зависимости активности от времени (1 ч 50 мин - 2 ч после введения инъекцией радиоактивного маркера). При использовании этой методики поглощение радиоактивного маркера в ксенотрансплантаты hPD-L1(+) L2987 было в 3,05 раза большим, чем наблюдаемое в ксенотрансплантатах hPD-L1(-) HT-29 у животных, получавших только радиоактивный маркер на основе ^{64}Cu -A02. У животных, которым вводили инъекцией совместно радиоактивный маркер на основе ^{64}Cu -A02 и 3 мг/кг немеченого аднектина A02 поглощение в ксенотрансплантатах hPD-L1(+) L2987 было лишь в 1,04 раза большим, чем наблюдаемое в ксенотрансплантатах hPD-L1(-) HT-29 (фиг. 4А и 4В)

Для некоторых исследований животных умерщвляли посредством смещения шейных позвонков непосредственно после визуализации. Затем проводили вскрытие животных и собирали отдельные ткани (кровь, сердце, легкое, печень, селезенку, почку, мышцу, желудок, кость, опухоль из L2987 и опухоль из HT-29) в предварительно взвешенные пробирки. Все ткани взвешивали снова для определения веса каждой ткани. Радиоактивность в каждой ткани затем измеряли непосредственно *ex vivo* с использованием

счетчика гамма-частиц Perkin-Elmer Wizard3. Для всех тканей измеренные значения в импульсах счета в минуту (СРМ) нормализовали к введенной инъекцией радиоактивной дозе для отдельных животных и корректировали с учетом радиоактивного распада. Эти результаты затем наносили на график, чтобы показать биологическое распределение радиоактивного маркера. Пример этого анализа для радиоактивного маркера на основе ^{18}F -A02 аднектина показан на фиг. 5. Эти результаты демонстрируют выраженное различающееся поглощение радиоактивного маркера в ксенотрансплантатах hPD-L1(+) L2987 по сравнению с ксенотрансплантатами hPD-L1(-) HT-29. Более того, единственной тканью с более высоким поглощением PD-L1 была ткань почки, что ожидалось, поскольку выведение ^{18}F -A02 аднектина производится посредством фильтрации почками, как ожидается, исходя из молекулярной массы молекулы.

В совокупности эти результаты обеспечивают непосредственную визуализацию различий между ксенотрансплантатами hPD-L1(+) и hPD-L1(-) опухолей *in vivo*. Специфичность дополнительно демонстрировалась совместным введением инъекцией 3 мг/кг немеченого аднектина к PD-L1 A02, приводящим в результате к уменьшению поглощения радиоактивного маркера в hPD-L1(+) опухолях до уровня ксенотрансплантатов hPD-L1(-). Это дополнительно подтверждает применение аднектинов к PD-L1 для визуализации экспрессии PD-L1 в ткани с использованием визуализации с помощью PET. Подобные эксперименты с использованием ^{18}F в качестве радионуклида проводили на мышах, и были получены аналогичные результаты, с достижением соотношения максимального поглощения радиоактивного маркера 3,53:1 у ксенотрансплантатов hPD-L1(+) L2987 по сравнению с ксенотрансплантатами hPD-L1(-) HT-29 с использованием радиоактивного маркера на основе ^{18}F -A02 аднектина.

Визуализирующие средства на основе аднектина к PD-L1 также показывали аналогичные результаты при проведении эксперимента на особях яванского макака. В этих исследованиях ^{18}F -E01 аднектин к PD-L1, полученный, как описано в вышеизложенных примерах, исследовали в отношении его способности обеспечивать высококонтрастные изображения у особей яванского макака. Описанные в данном документе аднектины к PD-L1 сохраняют высокую аффинность в отношении PD-L1 яванского макака (но характеризуются низкой аффинностью в отношении PD-L1 грызунов). Более того, поскольку особи яванского макака не содержат PD-L1(+) опухоли, как в мышиных моделях, характеристики визуализации оценивали преимущественно по фоновым уровням, измеренным на изображениях в условиях эндогенной экспрессии PD-L1 (причем низкий фоновый уровень обеспечивает потенциал для высокочувствительного выявления PD-L1(+) тканей). В этих исследованиях фоновые уровни у полученных в результате PET изображений были очень низкими, причем значительное накопление радиоактивного маркера наблюдалось преимущественно в почках, селезенке и мочевом пузыре.

Самцов яванского макака с ранее установленной порт-системой (VAP) для доступа к сосуду подвергали анестезии с использованием 0,02 мг/кг атропина, 5 мг/кг телазола и 0,01 мг/кг бупренорфина I.M. (внутримышечно) (все они загружены в один шприц). I.v. (внутривенный) катетер затем помещают в сосуд в головном мозге для введения жидкости в ходе процедуры визуализации для сохранения уровня жидкости. Животных интубировали эндотрахеальной трубкой - обычно 3,0 мм и переносили на площадку для визуализации инструмента microPET® F220™ PET (Siemens Preclinical Solutions, Ноксвилл, Теннесси). Анестезию поддерживали с использованием изофлурана и кислорода и I.V. жидкости (LRS) вводили со скоростью 6 мл/кг/ч в ходе процедуры визуализации. Поскольку аксиальное поле зрения у инструмента microPET® F220™ составляет всего 7,6 см, изображения в 5 отдельных положениях площадки получали для создания составного изображения животных от области чуть выше сердца до области, примерно соответствующей тазу.

Для каждого поля зрения вначале получали изображение в проходящих лучах, воздействующих в течение 10 мин, с использованием точечного источника ^{57}Co с целью коррекции затухания у окончательных PET изображений. После того как получали изображения в проходящих лучах для всех положений площадки, примерно 1,5 мКи (примерно 0,015 мг/кг) радиоактивного маркера на основе ^{18}F -E01 аднектина вводили через установленный VAP. Сканограммы при эмиссии длительностью 5 мин затем последовательно получали для каждого положения площадки, начиная в положении 1 с центром примерно в области сердца и двигаясь в направлении таза животного. После того как получали изображения в каждом положении (от 1 к 5), площадку для визуализации перемещали обратно в положение 1 и процесс повторяли. При использовании этой процедуры получали в общей сложности 5 отдельных изображений для каждого положения площадки в ходе исследования визуализации.

Отдельные изображения реконструировали с использованием алгоритма обратного проецирования с фильтрацией (FBP) с коррекцией затухания при использовании полученных изображений в проходящих лучах и скорректированное с учетом распада радиоактивного изотопа. Окончательные составные изображения затем получали посредством выравнивания изображений со всех 5 положений площадки, полученных за один проход (т.е. одно составное изображение получали из каждого набора последовательных изображений при положениях площадки с 1 по 5), охватывая период проведения исследования визуализации. Окончательные изображения оценивали визуально, чтобы отметить области с видимым поглощением радиоактивного маркера (т.е. селезенку, почку, мочевой пузырь) и фоновую ткань (мышцу) (фиг. 6). Фоновый уровень накопления ^{18}F -E01 аднектина был очень низким с незначительным сигналом,

наблюдаемым в фоновых тканях, таких как мышца. Кроме того, поглощение подтверждалось в селезенке, которая считается PD-L1(+), исходя из экспрессии мРНК. Таким образом, исследования на особях яванского макака демонстрируют потенциал для высокочувствительной визуализации PD-L1 применительно к эндогенному PD-L1.

Совместно, исследования PET у грызунов и особей яванского макака показывают, что меченые ^{64}Cu и ^{18}F аднектины к человеческому PD-L1 обеспечивают сильные и специфические зонды для *in vivo* мечення положительных по PD-L1 тканей с потенциалом в отношении высокочувствительного выявления тканей с низким уровнем экспрессии PD-L1.

Эксперименты по *in vivo* визуализации также проводили с использованием антитела к PD-L1, и области, в которой это визуализирующее средство выявляется, представляли собой те же области, которые выявлялись с использованием визуализирующего средства для PD-L1, тем самым подтверждая то, что визуализирующие средства на основе аднектина к PD-L1 успешно выявляют положительные по PD-L1 клетки *in vivo*.

Пример 16. *In vitro* автордиография ткани человека и ксенотрансплантата с использованием [^{18}F]-E01 аднектина к PD-L1

Ткани опухоли легкого человека заливали в OCT и охлаждали в 2-метилбутаноате в течение 2-5 мин до заморозания. Образцы хранили в морозильной камере при -80°C до использования. Ткани человеческого ксенотрансплантата также могли быть включены в анализ. Мышей, несущих двусторонние ксенотрансплантаты, получали посредством введения 4×10^6 hPD-L1(+) L2987 клеток и $1,5 \times 10^6$ hPD-L1(-) HT-29 клеток подкожно в противоположные бока *nu/nu* мышей. После того как образовавшиеся в результате ксенотрансплантаты опухолей достигали соответствующего размера (примерно $200\text{--}300\text{ мм}^3$), мыши получали анестезию с использованием 2% изофлурана, и их умерщвляли посредством смещения шейных позвонков. Свежие ткани опухоли вырезали, погружали в OCT и охлаждали в 2-метилбутаноате в течение 2-5 мин до заморозания. Ткани затем заворачивали в фольгу/ZIPLOC® мешок и хранили при -80°C до использования. Для всех тканей (опухоли легкого человека и ксенотрансплантатов) срезы толщиной 5 мкм (получали как 2 среза/препарат) получали с использованием криостата, их монтировали с оттаиванием на предметные стекла микроскопа и позволяли им сохнуть на воздухе в течение примерно 30 мин.

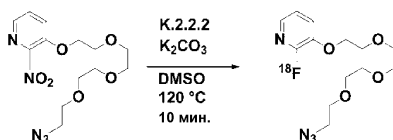
Исследования с блокированием "холодным" (немеченым) A02 аднектином в концентрации 0,025 нМ, 0,25 нМ, 2,5 нМ и 25 нМ, соответственно, и 25 нМ аднектином, не связывающимся с PD-L1, проводили с использованием следующих условий. Отдельные препараты в количестве 1 препарат на концентрацию помещали в пластиковые кассеты для препаратов и подвергали предварительному инкубированию в не содержащем бессывороточных белков блокирующем растворе Dako в течение 30 минут. Срезы затем переносили в стеклянные камеры для инкубирования препаратов для дальнейшего инкубирования. Отдельно, маточный раствор 0,25 нМ ^{18}F -A02 аднектина получали посредством разведения 10,6 мкл исходного маточного раствора радиоактивного лиганда (7064 нМ на момент эксперимента) 300 мл смеси PBS + 0,5% BSA. Из этого маточного раствора 40 мл добавляли в каждую камеру для инкубирования. Одна из этих камер содержала только буферный раствор с радиоактивным лигандом, который называли срезом с полным связыванием. В другие камеры для инкубирования добавляли 40 мл этого маточного раствора вместе с соответствующей концентрацией блокирующего соединения (немеченого A02 аднектина в концентрации 0,025, 0,25, 2,5 или 25 нМ или немеченого аднектина, не связывающегося с PD-L1, в концентрации 25 нМ). Срезы инкубировали в отдельных буферных растворах в течение 1 ч при комнатной температуре для достижения максимального связывания. После инкубирования срезы из каждой группы обработки удаляли из растворов для инкубирования и помещали в ледяной промывочный буфер (PBS + 0,5% BSA) на 3 мин и промывали отдельно 4 раза. Срезы затем сушили в потоке холодного воздуха в течение примерно 30 мин. Высушенные на воздухе препараты подвергали воздействию посредством помещения препаратов на планшеты для визуализации (BAS-SR 3545S) на ночь при комнатной температуре. Планшет для визуализации сканировали с использованием анализа для биовизуализации (Fujifilm Fluorescent Image Analyzer, FLA-9000). Размер пикселя на изображениях, полученных методом автордиографии, составлял 100 мкм. Анализ изображения выполняли с использованием программного обеспечения Multi-Gauge. Представляющие интерес участки (ROI) очерчивали таким образом, чтобы они окружали всю опухолевую ткань во всех исследуемых группах. Автордиографический сигнал от ассоциированной с тканью радиоактивности количественно определяли в этих ROI.

Видимое вытеснение радиоактивного лиганда на основе ^{18}F -A02 аднектина по сравнению со срезами с полным связыванием определяли для 4 разных концентраций (0,025, 0,25, 2,5 и 25 нМ) немеченого аднектина A02 как в срезах опухоли легкого человека, так и в срезах человеческих ксенотрансплантатов. Дозозависимое вытеснение ^{18}F -A02 наблюдали во всех срезах ткани с добавлением немеченого аднектина A02, тогда как 25 нМ аднектин, не связывающийся с PD-L1, показывал минимальную блокаду во всех тканях по сравнению с полным связыванием (фиг. 7).

Серии 5 мкм срезов ткани из каждой ткани подвергали процедуре иммуногистохимического окрашивания в отношении человеческого PD-L1 для подтверждения уровня экспрессии антигена PD-L1 в образцах (фиг. 8).

В совокупности эти результаты обеспечивают непосредственную визуализацию PD-L1 как в образцах опухоли легкого человека, так и в тканях человеческих ксенотрансплантатов. Уровень связывания радиоактивного лиганда в отдельных тканях соответствует интенсивности окрашивания PD-L1 в замороженных срезах с помощью ИHC (иммуногистохимическое окрашивание). Кроме того, дозозависимая блокада рецептора немеченым A02 аднектином к PD-L1 (и отсутствие блокады немеченым аднектином, не связывающимся с PD-L1) дополнительно подтверждает применение ^{18}F -A02 для визуализации экспрессии PD-L1 в ткани с использованием визуализации с помощью PET.

Пример 17. Автоматизированное получение ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей процедурой для радиохимического синтеза с использованием коммерческой установки для синтеза GE TRACERlab FX2 N



Процедура

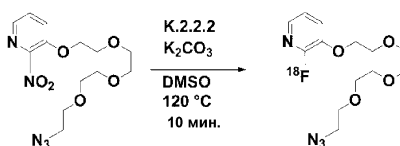
Автоматизированный синтез ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина осуществляли с использованием модуля для синтеза GE TRACERlab FX2 N, не относящегося к кассетному типу. Набор настроек установки для синтеза кратко изложен в табл. 4. Водный раствор ^{18}F -фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/800 мКи) доставляли в картридж Sep-Pak light QMA [картридж Sep-Pak light QMA подвергали последовательному предварительному кондиционированию с использованием 5 мл 0,5 М бикарбоната натрия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед применением]. По завершении этого переноса водный ^{18}F -фторид высвобождали из картриджа QMA Sep-Pak посредством добавления смеси для элюирования (из "V1") в реактор. Растворитель выпаривали в слабом потоке азота и в вакууме. Раствор предшественника (из "V3") добавляли к высушенному остатку криптанда и эту реакционную смесь нагревали до 120°C в течение 10 мин. Затем 4 мл дистиллированной воды (из "V4") добавляли к неочищенной реакционной смеси в реакторе и смесь переносили в 5 мл петлю для впрыскивания образца в системе для полупрепаративной HPLC через датчик для жидкости, который контролирует окончание загрузки. Смесь загружали на колонку для полупрепаративной HPLC (Luna C18(2), 250x10 мм, Phenomenex). Смесь 35% ацетонитрила в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты прокачивали через колонку со скоростью 4,6 мл в минуту.

Продукт собирали из этой колонки для HPLC в колбу для разведения, которая содержала 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили в картридж для экстракции твердой фазы tC18, 1 грамм. 352 мКи (13 ГБк) ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина высвобождали из этого картриджа (из "V14") с использованием 3 мл этанола и можно применять для получения меченых ^{18}F биологических продуктов, пользуясь преимуществом "клик"-реакции азид-алкин с соответствующим биологическим продуктом, содержащим алкины.

Таблица 4

Флакон 1 (V1)	16 мг K.2.2.2, 3 мг карбоната калия, растворенные в 0,1 мл дистиллированной воды и 1,4 мл ацетонитрила
Флакон 3 (V3)	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина в 0,5 мл DMSO
Флакон 4 (V4)	4 мл дистиллированной воды
Флакон 14 (V14)	3 мл 100% этанола
Колба для разведения	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 (C1)	tC18 6 cc 1g sep pack
Колонка для HPLC	Luna C18(2), 250x10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель для HPLC	35% ацетонитрила в водном растворе 0,1% трифторуксусной кислоты
Скорость потока для HPLC	4,6 мл/мин.

Пример 18. Автоматизированное получение ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей процедурой для радиохимического синтеза на установке для синтеза IBA Synthera



Процедура

Автоматизированный синтез ^{18}F -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин

осуществляли с использованием модуля для синтеза IBA Synthera Synthesis кассетного типа и соответствующим образом собранного набора интегрирующего потокового процессора. В набор интегрирующего потокового процессора (IFP) загружали соответствующие предшественники для этого синтеза, и они кратко изложены в табл. 5. Очистку проводили на установке для HPLC Varian. Заполнение петли для впрыскивания в систему HPLC контролировалось постоянным потоком азота в установке для HPLC. Набор настроек для обоих автоматов кратко изложен в табл. 2. Водный раствор [^{18}F]-фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/ 800 мКи) доставляли в картридж Sep-Pak light QMA [картридж Sep-Pak light QMA подвергали последовательному предварительному кондиционированию с использованием 5 мл 0,5 М бикарбоната натрия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед применением]. По завершении этого переноса водный [^{18}F]-фторид высвобождали из картриджа QMA Sep-Pak посредством добавления смеси для элюирования (из "V1") в реактор. Растворитель выпаривали в слабом потоке азота и в вакууме. Раствор предшественника (из "V2") добавляли к высушенному остатку криптана и эту реакционную смесь нагревали до 120°C в течение 10 мин. Затем 3 мл дистиллированной воды (из "V4") добавляли к неочищенной реакционной смеси в реакторе и смесь переносят в 5 мл петлю для впрыскивания образца в систему для полупрепаративной HPLC через датчик для жидкости, который контролирует окончание загрузки. Смесь загружали на колонку для полупрепаративной HPLC (Luna C18(2). 250×10 мм, Phenomenex). Смесь 35% ацетонитрила в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты прокачивали через колонку со скоростью 4,6 мл в минуту. Продукт собирали из этой колонки для HPLC в колбу для разведения, которая содержала 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили в картридж для экстракции твердой фазы tC18, 1 г. 325 мКи (12 ГБк) [^{18}F]-3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина высвобождали из этого картриджа с использованием 3 мл этанола и можно применять для получения меченых ^{18}F биологических продуктов, пользуясь преимуществом "клик"-реакции азид-алкин с соответствующим биологическим продуктом, содержащим алкины.

Таблица 5.

Флакон 1 (V1)	22 мг К.2.2.2, 4 мг карбоната калия, растворенные в 0,3 мл дистиллированной воды и 0,3 мл ацетонитрила
Флакон 2 (V2)	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина в 0,5 мл DMSO
Флакон 4 (V4)	3 мл дистиллированной воды
Колба для разведения	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 (C1)	tC18 6 cc 1g sep pack
Колонка для HPLC	Luna C18(2), 250×10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель для HPLC	35% ацетонитрила в водном растворе 0,1% трифторуксусной кислоты
Скорость потока для HPLC	4,6 мл/мин.

Пример 19. Синтез зондов на основе ^{68}Ga аднектина к PD-L1

Синтез ^{68}Ga -E01-NODAGA

[^{68}Ga]-хлорид галлия в 0,1 н растворе соляной кислоты нейтрализовали 32 мг ацетата натрия (NaOAc) в течение 4 мин при температуре окружающей среды, полученный в результате раствор перемешивали для обеспечения соответствующего смешивания в полном объеме. Этот раствор затем добавляли к раствору E01-NODAGA (15 мкл в концентрации 1,3 мг/мл) и неочищенную реакционную смесь осторожно пипетировали, чтобы обеспечить смешивание, а затем оставляли отстояться при комнатной температуре на 15 мин. Содержимое неочищенной реакционной смеси переносили в обессоливающую колонку PD-10, которую предварительно активировали с использованием 20 мл 1× фосфатно-буферного солевого раствора (PBS, pH 7,4) перед загрузкой образца. Дополнительные 1,5 мл 1X PBS добавляли в колонку с последующим добавлением дополнительных 0,8 мл 1X раствора PBS и эти фракции сливали. [^{68}Ga]-E01-NODAGA затем собирали после 1,4 мл элюирования PD-10 колонки с получением 5,78 мКи (214 МБк) в виде желаемого продукта. Контроль качества выполняли с помощью системы для обращенно-фазовой HPLC с использованием колонки для HPLC Agilent PLRP-S с размером: 250×4,60 мм, 8 мкм, выявлением при 280 нм и подвижной фазой из 0,1% муравьиной кислоты в дистиллированной воде и ацетонитриле. Метод создания градиента использовали в случае, когда процент ацетонитрила повышали линейно от 10 до 45% в течение 30-минутного временного интервала. [^{68}Ga]-E01-NODAGA элюировался совместно с эталонным стандартом во фракции, соответствующей 22-минутной отметке на HPLC хроматограмме. Измеренная радиохимическая чистота составляла 98% при использовании этого метода. [^{68}Ga]-E01-NODAGA также элюировался совместно с эталонным материалом во фракции, соответствующей 20-минутной отметке при использовании гель-хроматографии (SEC), колонка: GE Superdex 200 GL Размер: 10×300 мм, выявление при 280 нм.

1 MGVS D VPRDL EVVAA TPTSL LISWR AQLSP SFYYR ITYGE
 41 TGGNS PVQEF TVPND VMTAT ISGLK PGVDY TITVY AVTTH
 81 GVFY SPISI NYRTP CHHHH HH

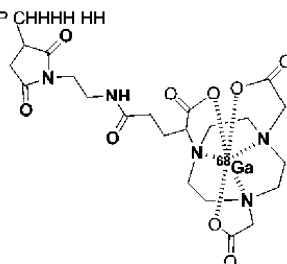


Таблица 3. Перечень последовательностей

SEQ ID	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Полноразмерный человеческий ¹⁰ Fn3 домен дикого типа	VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISIN YRT
2	Коровья последовательность человеческого ¹⁰ Fn3 домена дикого типа	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP GSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISIN YRT
3	Коровья последовательность каркаса на основе ¹⁰ Fn3 с переменными AB, BC, CD, DE, EF и FG петлями	EVVAA (Z) LLISW (Z) YRITY (Z) FTV (Z) ATISGL (Z) Y TITVYA (Z) ISIN YRT
4	Коровья последовательность каркаса на основе ¹⁰ Fn3 с переменными BC, DE и FG петлями	EVVAATPTSLISW (Z) YRITYGETGGNSPVQEFTV (Z) ATISGLKPGVDYTITVYA (Z) ISIN YRT
5	Коровья последовательность ATI-968 (также известный как ADX_1760_C01)	EVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRT
6	BC петля ATI-968	IAPFYNVIY
7	DE петля ATI-968	PGTGYT
8	FG петля ATI-968	VTDGASIASYAFP
9	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRT
10	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRTHHHHHH
11	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRTEIDKPSQ
12	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRTEIDKPSQH HHHHHH
13	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRTPC
14	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNVIYRITYGETGGNSPVQEFTVP GTGTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGASIASYAFPISIN YRTPCHHHHHH

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	
15	ATI-968 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAFPFYNYIYRITYGETGGNSPVQEFVTPGTGYTATISGLKPGVDYITITVYAVTDGASIASYAFPI SINYTEIDKPSQHNNHHH
16	ATI-968 – коровая последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGTGATCAGCTGGATCGCTCCGTCTACAATGTCATCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTACTGGTTATACAGCTACAATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGATGGAGCATCCATTGCTTCATACGCGTTTCCAATTCCATTAATTACCGCAC
17	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGTGATCAGCTGGATCGCTCCGTCTACAATGTCATCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTACTGGTTATACAGCTACAATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGATGGAGCATCCATTGCTTCATACGCGTTTCCAATTCCATTAAATTACCGCAC
18	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGTGATCAGCTGGATCGCTCCGTCTACAATGTCATCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTACTGGTTATACAGCTACAATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGATGGAGCATCCATTGCTTCATACGCGTTTCCAATTCCATTAAATTACCGCACACCGTGC
19	ATI-968 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGTGATCAGCTGGATCGCTCCGTCTACAATGTCATCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTACTGGTTATACAGCTACAATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGATGGAGCATCCATTGCTTCATACGCGTTTCCAATTCCATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCAACCACTGA
20	Коровая последовательность ATI-964 (исходная последовательность для ADX 5322 A02)	EVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAAHYRESPI SINYRT
21	BC петля ATI-964	SYDGSIERY
22	DE петля ATI-964	PPDQKT
23	FG петля ATI-964	VRLEEAAHYRESP
24	ATI-964 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAAHYRESPI SINYRT
25	ATI-964 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAAHYRESPI SINYRTHHHHHH
26	ATI-964 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAAHYRESPI SINYRTEIDKPSQ
27	ATI-964 w/ N-лидерная последовательность и С-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAAHYRESPI SINYRTEIDKPSQHNNHHH

	хвостовая последовательность + his-метка	
28	АТИ-964 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPV QEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITIVYAVRLEEAHYYRESPISIN YRTPC
29	АТИ-964 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPV QEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITIVYAVRLEEAHYYRESPISIN YRTPCNNHHNNH
30	АТИ-964 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPV QEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITIVYAVRLEEAHYYRESPISI NYRTEIDKPSQNNHHNNH
31	АТИ-964 – коровая последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCGCCTGCTGATCAGCTGGTCTT ACGACGGTTCGATTGAACGTTATACCGCATCACTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCTCCGGATCAG AAGACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTGCGGCTGGAAGAAGCTCATTACTATCGAGA GTCTCCAATTTCCATTAATTACCGCACA
32	АТИ-964 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGACGGTTCGATTGA ACGTTATACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CAGGCTGGAAGAAGCTCATTACTATCGAGAGTCTCCAATTTCCATT AATTACCGCACA
33	АТИ-964 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGACGGTTCGATTGA ACGTTATACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CAGGCTGGAAGAAGCTCATTACTATCGAGAGTCTCCAATTTCCATT AATTACCGCACACCGTGC
34	АТИ-964 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGACGGTTCGATTGA ACGTTATACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CAGGCTGGAAGAAGCTCATTACTATCGAGAGTCTCCAATTTCCATT AATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACC ACCACTGA
35	Коровая последовательность АТИ-965	EVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPVQEFTVGP RHHTATISGLKPGVDYITIVYAVYHTEPGYHAHMPISINYRT
36	BC петля АТИ-965	ТАYDSVDKY
37	DE петля АТИ-965	GPRHHT
38	FG петля АТИ-965	VYHTEPGYHAHMP
39	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGP RHHTATISGLKPGVDYITIVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRT

40	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRTHHHHHH
41	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRTEIDKPSQ
42	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRTEIDKPSQHNNHHH
43	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRTPC
44	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGETGGNSPV QEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHAHMPISIN YRTPCHNNHHH
45	АТИ-965 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYDSVDKYYRITYGE TGGNSPVQEFTVGPRHHTATISGLKPGVDYTTITVYAVYHTEPGYHA HMPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
46	АТИ-965 – коровья последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGACTG CATACGACTCTGTGACAAATATTACCGCATCACTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGGGCCCTAGACAT CACACAGCTACCATCAGCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCTATCAGCTGAACCGGGCTATCATGCTCA TATGCCAATTTCATTAATTACCGCACA
47	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGACTGCATACGACTCTGTTGA CAAATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGGGCCCTAGACATCACACAGCTACCATCA GCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CTATCAGCTGAACCGGGCTATCATGCTCATATGCCAATTTCCATT AATTACCGCACA
48	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGACTGCATACGACTCTGTTGA CAAATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGGGCCCTAGACATCACACAGCTACCATCA GCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CTATCAGCTGAACCGGGCTATCATGCTCATATGCCAATTTCCATT AATTACCGCACACCGTGC
49	АТИ-965 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCACCCAGCCTGCTGATCAGCTGGACTGCATACGACTCTGTTGA CAAATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGGGCCCTAGACATCACACAGCTACCATCA GCGGCCCTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CTATCAGCTGAACCGGGCTATCATGCTCATATGCCAATTTCCATT AATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACC ACCACTGA

50	Коровая последовательность АТИ-966	EVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRT
51	BC петля АТИ-966	HRFSSIMAY
52	DE петля АТИ-966	AGSVNT
53	FG петля АТИ-966	VTIHNVSFP
54	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRT
55	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTHHHHH
56	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTEIDKPSQ
57	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTEIDKPSQHNNHHH
58	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTPC
59	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTPCHNNHHH
60	АТИ-966 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYITITVYAVTIHNVSPFISINYRTEIDKPSQHNNHHH
61	АТИ-966 – коровая последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCATA GGTTCCTCTCTATCATGGCGTATTACCGCATCACTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGGCTGGCTCTGTT AACACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCACGATCCATAACGTTTCTTTCCCAATTTC CATTAATTACCGCACA
62	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCATAGGTTCTCTTCTATCAT GGCCTATTACCGCATCACTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGGCTGGCTCTGTTAACACAGCTACCATCA CGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACGATCCATAACGTTTCTTTCCCAATTTCATTAATTACCGCACA
63	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCATAGGTTCTCTTCTATCAT GGCCTATTACCGCATCACTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGGCTGGCTCTGTTAACACAGCTACCATCA CGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACGATCCATAACGTTTCTTTCCCAATTTCATTAATTACCGCACA CCGTGC

64	АТИ-966 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCATAGTTCTCTTCTATCAT GGCGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGGCTGGCTCTGTTAACACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CAGGATCCATAACGTTTCTTTCCCAATTCCATTAATTACCGCAC GAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCACTGA
65	Коровая последовательность АТИ-967 (исходная последовательность для ADX_5417_E01)	EVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFTVPVAS GTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVRT
66	BC петля АТИ-967	QQLSPSFY
67	DE петля АТИ-967	PVASGT
68	FG петля АТИ-967	VTSHGIYFYAP
69	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR T
70	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR TNNHHH
71	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR TEIDKPSQ
72	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR TEIDKPSQNNHHH
73	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR TPC
74	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISINVR TPCHNNHH
75	АТИ-967 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYYRITYGETGGNSP VQEFTVPVASGTATISGLKPGVDYTTITVYAVTSHGIYFYAPISIN RTEIDKPSQNNHHH
76	АТИ-967 – коровая последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCAGG GACAGCTGTCTCCGTCTTTCTATTACCGAATCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGCTAGT GGGACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCACTTCTCATGGCATATACTTCTACGCTCC AATTCCATTAATTACCGCACA
77	АТИ-967 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCAGGGACAGCTGTCTCCGTC TTTCTATTACCGAATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGCTAGTGGGACAGCTACCATCA

	последовательность с N-концевым метионином)	GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTTCTCATGGCATATACTTCTACGCTCCAATTTCCATTAATTACCGCAC
78	API-967 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCAGGGACAGCTGTCTCCGCTCTTCTATTACCGAATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGCTAGTGGGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTTCTCATGGCATATACTTCTACGCTCCAATTTCCATTAATTACCGCACACCGTGC
79	API-967 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGCAGGGACAGCTGTCTCCGCTCTTCTATTACCGAATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGTTGCTAGTGGGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTTCTCATGGCATATACTTCTACGCTCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCACTGAT
80	Коровья последовательность ADX_5322_A02	EVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRT
81	BC петля ADX_5322_A02	SYDGPIDRY
82	DE петля ADX_5322_A02	PPDQKT
83	FG петля ADX_5322_A02	VRLEEAHYNREFP
84	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRT
85	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRTHNNNNH
86	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRTEIDKPSQ
87	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRTEIDKPSQNNNNHH
88	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRTPC
89	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFPISIN YRTPCHNNNNH

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	
90	ADX_5322_A02-Mal-DBCO-FFPF18	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFFPISIN YRTPC- [MaLeamide-DBCO-FFP (18F)]
91	Полноразмерный ADX_5322_A02	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFFPISIN YRTPCHHHHHH
92	ADX_5322_A02 – коровая последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGATGGCCCAATTGACCGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTCCGGATCAG AAGACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCCGGCTGGAAGAAGCTCATTACAATCGAGA GTTTCACATTTCCATTAATTACCGCACA
93	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGATGGCCCAATTGA CCGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGCCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CCGGCTGGAAGAAGCTCATTACAATCGAGAGTTTCCAATTTCCATT AATTACCGCACA
94	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGATGGCCCAATTGA CCGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGCCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CCGGCTGGAAGAAGCTCATTACAATCGAGAGTTTCCAATTTCCATT AATTACCGCACACCGTGC
95	ADX_5322_A02 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGTCTTACGATGGCCCAATTGA CCGGTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCACTGTGCCTCCGGATCAGAAGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CCGGCTGGAAGAAGCTCATTACAATCGAGAGTTTCCAATTTCCATT AATTACCGCACACCGTGCCACCATCACCACCACCTGA
96	Коровая последовательность ADX_5417_E01	EVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFTVPNDV MTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSFISIN YRT
97	BC петля ADX_5417_E01	RAQLSPSFY
98	DE петля ADX_5417_E01	PNDVMT
99	FG петля ADX_5417_E01	VTTHGVYFYSF
100	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSFISIN YRT
101	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSFISIN YRTNNHHH

102	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSPI SIN YR TEIDKPSQ
103	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSPI SIN YR TEIDKPSQHNNHHH
104	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSPI SIN YR TPC
105	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSPI SIN YR TPCHNNHHH
106	ADX-5417_E01 –Mal-DBCO-FFPF18	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDPQKTATISGLKPGVDYITITVYAVRLEEAHYNREFFISIN YRTPC- [Maleamide-DBCO-FFP (18F)]
107	Полноразмерный ADX-5417_E01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPV QEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYITITVYAVTTHGVYFYSPI SIN YR RTPCHNNHHH
108	ADX-5417_E01 – коровья последовательность (нуклеотидная последовательность)	GAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAGGG CTCAGCTGTCTCCGTCTTTCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAAC AGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTCACTGTGCCTAATGATGTA ATGACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCA TCACTGTGTATGCTGTCACTACTCATGGTGTATTATTTCTACTACC AATTTCCATTAATTACGCACA
109	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAGGGCTCAGCTGTCTCCGTC TTTCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTAATGATGTAATGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTACTCATGGTGTATTATTTCTACTACCAATTTCCATTAATTAC CGCACA
110	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAGGGCTCAGCTGTCTCCGTC TTTCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTAATGATGTAATGACAGCTACCATCA GCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT CACTACTCATGGTGTATTATTTCTACTACCAATTTCCATTAATTAC CGCACACCGTGC
111	ADX_5417_E01 w/ N-лидерная последовательность и C-	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGTTGCTGCCA CCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGAGGGCTCAGCTGTCTCCGTC TTTCTATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCT GTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTAATGATGTAATGACAGCTACCATCA

	хвостовая последовательность + his-метка (нуклеотидная последовательность с N-концевым метионином)	GCGGCCTTAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTACTCATGGTGTATTCTACTCACCATTTCATTAAATTACCGCACACCGTGCCACCATCACCACCACCACTGA
112	Коровая последовательность ATI_1420_A10	EVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRT
113	BC петля ATI_1420_A10	PYPSSYYIE
114	DE петля ATI_1420_A10	IRHPGMLEFG
115	FG петля ATI_1420_A10	VTDGASIASYAFP
116	ATI_1420_A10 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRT
117	ATI_1420_A10 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTHHHHHH
118	ATI_1420_A10 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTEIDKPSQ
119	ATI_1420_A10w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTEIDKPSQHNNHHHH
120	ATI_1420_A10w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTPC
121	ATI_1420_A10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTPCHHHHHH
122	ATI_1420_A10–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPSYYIEYRITYGETGGNSPVQEFTVQSMKATISGLKPGVDYTTITVYAIRHPGMLEFGISINVRTEIDKPSQHNNHHHH
123	Коровая последовательность ATI_1420_B09	EVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSPVQEFTVGSVNATISGLKPGVDYTTITVYAIHNVGFISINVRT
124	BC петля ATI_1420_B09	HKFSSLMs
125	DE петля ATI_1420_B09	GSVN
126	FG петля ATI_1420_B09	IHNvGF

127	ATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRT
128	ATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTHHH HHH
129	AATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTEID KPSQ
130	ATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTEID KPSQHNNHHH
131	ATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTPC
132	ATI_1420_B09 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTPCH HHHHH
133	ATI_1420_B09–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNS PVQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTEI DKPSQHNNHHH
134	Коровая последовательность ATI_1420_C02	EVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSPVQEFTVRQHV ATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINRYRT
135	BC петля ATI_1420_C02	RIKSYAA
136	DE петля ATI_1420_C02	RQHV
137	FG петля ATI_1420_C02	RLGDVELVYE
138	ATI_1420_C02 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSPV QEFTVRQHVATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINRYRT
139	ATI_1420_C02 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMsYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINRYRTHHH HHH
140	ATI_1420_C02 w/ N-лидерная последовательность и C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSPV QEFTVRQHVATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINRYRT EIDKPSQ

	хвостовая последовательность	
141	ATI_1420_C02 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSPV QEFTVRQHVATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINYRT EIDKPSQHHNNHH
142	ATI_1420_C02 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSPV QEFTVRQHVATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINYRT PC
143	ATI_1420_C02 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHKFSSLMYSYRITYGETGGNSP VQEFTVGSVNATISGLKPGVDYITVYAIHNVGFISINYRTFCH HHNNH
144	ATI_1420_C02– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYAYRITYGETGGNSP VQEFTVRQHVATISGLKPGVDYITVYARLGDVELVYEISINYR TEIDKPSQHHNNHH
145	Коровая последовательность ATI_1420_C11	EVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYSS GATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYRT
146	BC петля ATI_1420_C11	MYPLKSVF
147	DE петля ATI_1420_C11	YSSG
148	FG петля ATI_1420_C11	MSYSTYHAFM
149	ATI_1420_C11 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYR T
150	ATI_1420_C11 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYR THNNHH
151	ATI_1420_C11 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYR TEIDKPSQ
152	ATI_1420_C11 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYR TEIDKPSQHHNNHH
153	ATI_1420_C11 w/ N- лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYR TPC

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC	
154	ATI_1420_C11 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVPRITYGETGGNSPVQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYRTPCHNNHHHH
155	AATI_1420_C11–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMPKSVPRITYGETGGNSPVQEFTVYSSGATISGLKPGVDYITVYAMSYSTYHAFMISINYRTEIDKPSQHNNHHHH
156	Коровая последовательность ATI_1420_D01	EVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRT
157	BC петля ATI_1420_D01	RTVPETD
158	DE петля ATI_1420_D01	PDNT
159	FG петля ATI_1420_D01	LETAHYNRDY
160	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRT
161	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTHNNHHHH
162	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTEIDKPSQ
163	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTEIDKPSQHNNHHHH
164	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTPC
165	ATI_1420_D01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTPCHNNHHHH
166	ATI_1420_D01–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRTVPETDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDNTATISGLKPGVDYITVYALETAHYNRDYISINYRTEIDKPSQHNNHHHH

167	Коровая последовательность ATI_1420_D05	EVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSPVQEFTVGPK HHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRT
168	BC петля ATI_1420_D05	TAYYSTIK
169	DE петля ATI_1420_D05	GPKHH
170	FG петля ATI_1420_D05	YNTKPGYHAHQ
171	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRT
172	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRTHHHHHH
173	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRTEIDKPSQ
174	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRTEIDKPSQHNNHHH
175	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRTPC
176	ATI_1420_D05 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNSP VQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISIN YRTPCHNNHHH
177	ATI_1420_D05– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTAYYSTIKYRITYGETGGNS PVQEFTVGPKHHATISGLKPGVDYTTITVYAYNTKPGYHAHQISI NYRTEIDKPSQHNNHHH
178	Коровая последовательность ATI_1420_D10	EVVAATPTSLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSPVQEFTVYQK YATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISIN YRT
179	BC петля ATI_1420_D10	RIPSYHIQ
180	DE петля ATI_1420_D10	YQKY
181	FG петля ATI_1420_D10	VSPPKQLRFG
182	ATI_1420_D10 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISIN YR T

183	ATI_1420_D10 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISINYR TННННННННН
184	ATI_1420_D10 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISINYR TEIDKPSQ
185	ATI_1420_D10 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISINYR TEIDKPSQННННННННН
186	ATI_1420_D10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISINYR TPC
187	ATI_1420_D10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNSP VQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISINYR TPCHННННННННН
188	ATI_1420_D010–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRIPSYHIQYRITYGETGGNS PVQEFTVYQKYATISGLKPGVDYTTITVYAVSPPKQLRFGISIN YRTEIDKPSQННННННННН
189	ATI_1420_F10 коровая последовательность	EVVAATPTSLLISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYPY MATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRT
190	BC петля ATI_1420_F10	PAPPSYVF
191	DE петля ATI_1420_F10	YPYM
192	FG петля ATI_1420_F10	YTSGFS
193	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRT
194	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTHH HHH
195	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTEID KPSQ
196	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность и C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTEID KPSQННННННННН

	хвостовая последовательность + his-метка	
197	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTPC
198	ATI_1420_F10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWPAPPSYVFYRITYGETGGNSP VQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTPCH HHHHH
199	ATI_1420_F10–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWPAPPSYVFYRITYGETGGNS PVQEFTVYPYMATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGFSISINYRTEI DKPSQHNNHHH
200	ATI_1421_C05 коровая последовательность	EVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQR ATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT
201	BC петля ATI_1421_C05	YMDHKS
202	DE петля ATI_1421_C05	PDQR
203	FG петля ATI_1421_C05	LSEAHYLRDK
204	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT
205	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT HHHHHH
206	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT EIDKPSQ
207	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT EIDKPSQHNNHHH
208	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT PC
209	ATI_1421_C05 w/ N-лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQRATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHYLRDKISINYRT PCHHHHHH

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	
210	ATI_1421_C05–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYMDHKSRYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQRAATISGLKPGVDYTTVYALSEAHYLRDKISINYRTEIDKPSQHNNNNH
211	Коровая последовательность ATI_1421_C06	EVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRT
212	BC петля ATI_1421_C06	ENLASQ
213	DE петля ATI_1421_C06	PDQA
214	FG петля ATI_1421_C06	LQTAHYRQH
215	ATI_1421_C06 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRT
216	ATI_1421_C06 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTNNNNH
217	ATI_1421_C06w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTEIDKPSQ
218	ATI_1421_C06 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTEIDKPSQHNNNNH
219	ATI_1421_C06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTPC
220	ATI_1421_C06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTPCHNNNNH
221	ATI_1421_C06–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQAATISGLKPGVDYTTVYALQTAHYRQHISINYRTEIDKPSQHNNNNH
222	Коровая последовательность ATI_1421_D05	EVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPVQEFVTPDQSATISGLKPGVDYTTVYALEKAHYRQNIISINYRT
223	BC петля ATI_1421_D05	YVQYND
224	DE петля ATI_1421_D05	PDQS

225	FG петля ATI 1421_D05	LEKAHYRQN
226	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT
227	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT HHHHHH
228	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT EIDKPSQ
229	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT EIDKPSQHNNHHH
230	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT PC
231	ATI 1421_D05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT PCHNNHHH
232	ATI 1421_D05 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYVQYNDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNI SINYRT TEIDKPSQHNNHHH
233	Коровая последовательность ATI_1421_D06	EVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQY ATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT
234	BC петля ATI 1421_D06	GHNYDDE
235	DE петля ATI 1421_D06	PDQY
236	FG петля ATI 1421_D06	LAEAHVRKNH
237	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT
238	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT HHHHHH
239	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность и C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT EIDKPSQ

	хвостовая последовательность	
240	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT EIDKPSQHNNHHH
241	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT PC
242	ATI_1421_D06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYRT PCHNNHHH
243	ATI_1421_D06 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGHNYDDEYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQYATISGLKPGVDYITVYALAEAHVRKNHISINYR TEIDKPSQHNNHHH
244	Коровая последовательность ATI_1421_E03	EVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQK ATISGLKPGVDYITVYALAEAHVKRDSISINYRT
245	BC петля ATI_1421_E03	VYHYDAQ
246	DE петля ATI_1421_E03	PDQK
247	FG петля ATI_1421_E03	LSEAHNKRDS
248	ATI_1421_E03 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEAHNKRDSISINYRT NNHHHH
249	ATI_1421_E03w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEAHNKRDSISINYRT EIDKPSQ
250	ATI_1421_E03w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEAHNKRDSISINYRT EIDKPSQHNNHHH
251	ATI_1421_E03 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEAHNKRDSISINYRT PC
252	ATI_1421_E03 w/ N-лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEAHNKRDSISINYRT PCHNNHHH

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC	
253	ATI_1421_E03 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHHKRDSISINYRT
254	ATI_1421_E03 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALSEAHHKRDSISINYRTEIDKPSQHNNHHH
255	Коровая последовательность ATI_1421_E04	EVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRT
256	BC петля ATI_1421_E04	SYNGPIE
257	DE петля ATI_1421_E04	PDQQ
258	FG петля ATI_1421_E04	LEEAHYSRQS
259	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRT
260	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTHNNHHH
261	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTEIDKPSQ
262	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTEIDKPSQHNNHHH
263	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTPC
264	ATI_1421_E04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTECHNNHHH
265	ATI_1421_E04 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYNGPIEYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTITVYALEEAHYSRQSSISINYRTEIDKPSQHNNHHH

266	Коровая последовательность ATI_1421_F03	EVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQS ATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT
267	BC петля ATI_1421_F03	ISVQTYD
268	DE петля ATI_1421_F03	PDQS
269	FG петля ATI_1421_F03	LEKAHYRQN
270	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT
271	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT HHHHHH
272	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT EIDKPSQ
273	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT EIDKPSQHNNHHH
274	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT PC
275	ATI_1421_F03 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYRT PCHNNHHH
276	ATI_1421_F03– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYDYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNIISINYR TEIDKPSQHNNHHH
277	Коровая последовательность ATI_1421_F05	EVVAATPTSLISWLARHDARYRITYGETGGNSPVQEFTVPDRM ATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHYRRLYISINYRT
278	BC петля ATI_1421_F05	IARHDAR
279	DE петля ATI_1421_F05	PDRM
280	FG петля ATI_1421_F05	LEQAHYRRLY
281	ATI_1421_F05 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLARHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHYRRLYISINYRT

282	ATI_1421_F05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYRT HHHHHH
283	ATI_1421_F05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYRT EIDKPSQ
284	ATI_1421_F05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYRT EIDKPSQHNNHHH
285	ATI_1421_F05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYRT PC
286	ATI_1421_F05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSPV QEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYRT PCHNNHHH
287	ATI_1421_F05–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLRHDARYRITYGETGGNSP VQEFTVPDRMATISGLKPGVDYITVYALEQAHYYRLYISINYR TEIDKPSQHNNHHH
288	Коровая последовательность ATI_1421_G07	EVVAATPTSLISWHSPTSGITYRITYGETGGNSPVQEFTVPYD PSATISGLKPGVDYITVYAPYGSQYYPGYHISINYRT
289	BC петля ATI_1421_G07	HSPTSGIT
290	DE петля ATI_1421_G07	PYDPS
291	FG петля ATI_1421_G07	PYGSQYYPGYH
292	ATI_1421_G07 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRT
293	ATI_1421_G07 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRTHNNHHH
294	ATI_1421_G07 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRTEIDKPSQ
295	ATI_1421_G07 w/ N-лидерная	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRTEIDKPSQHNNHHH

	последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	
296	АТІ_1421_G07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPSTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYTTITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRTPC
297	АТІ_1421_G07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPSTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYTTITVYAPYGSQYYPGYHISIN YRTPCHHHHHH
298	АТІ_1421_G07–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHSPSTSGITYRITYGETGGNSP VQEFTVPYDPSATISGLKPGVDYTTITVYAPYGSQYYPGYHISI NYRTEIDKPSQHNNHHH
299	Коровая последовательность АТІ_1421_H03	EVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDSS ATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT
300	BC петля АТІ_1421_H03	VYHYDAQ
301	DE петля АТІ_1421_H03	PDSS
302	FG петля АТІ_1421_H03	LEQAHIDRTT
303	АТІ_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT
304	АТІ_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT HHHHHH
305	АТІ_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT EIDKPSQ
306	АТІ_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT EIDKPSQHNNHHH
307	АТІ_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTITVYALEQAHIDRTTISINYRT PC

308	ATI_1421_H03 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTVYALEQAHIDRTTISINYRT PCNNHHHH
309	ATI_1421_H03 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSP VQEFTVPDSSATISGLKPGVDYTTVYALEQAHIDRTTISINYR TEIDKPSQNNHHHH
310	Коровая последовательность ATI_1421_H05	EVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQH ATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT
311	BC петля ATI_1421_H05	TSVLLKD
312	DE петля ATI_1421_H05	PDQH
313	FG петля ATI_1421_H05	LQNAHHERLY
314	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT
315	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT NNHHHH
316	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT EIDKPSQ
317	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT EIDKPSQNNHHHH
318	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT PC
319	ATI_1421_H05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYRT PCNNHHHH
320	ATI_1421_H05 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTSVLLKDYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQHATISGLKPGVDYTTVYALQNAHHERLYISINYR TEIDKPSQNNHHHH
321	Коровая последовательность ATI_1422_E06	EVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPVQEFTVSKDL ATISGLKPGVDYTTVYAFNGSSYYTFGISINYRT

322	BC петля ATI 1422 E06	LPSYYIT
323	DE петля ATI 1422 E06	SKDL
324	FG петля ATI 1422 E06	FNGSSYYTFG
325	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT
326	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT EIDKPSQHNNHHH
327	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT EIDKPSQHNNHHH
328	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT PC
329	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT PCHNNHHH
330	ATI_1422_E06 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSPV QEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYRT EIDKPSQHNNHHH
331	ATI_1422_E06–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWLPSSYYITYRITYGETGGNSP VQEFTVSKDLATISGLKPGVDYITVYAFNGSSYYTFGISINYR T
332	Коровая последовательность ATI 1422 F04	EVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSPVQEFTVYKN YATISGLKPGVDYITVYASEGIMFYNISINYRT
333	BC петля ATI 1422 F04	SIPSYFIS
334	DE петля ATI 1422 F04	YKNY
335	FG петля ATI 1422 F04	SEGIMFYN
336	ATI_1422_F04w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYITVYASEGIMFYNISINYRT
337	ATI_1422_F04w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYITVYASEGIMFYNISINYRTH NNHHH

338	ATI_1422_F04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYTTITVYASEGIMFYNISINYRTE IDKPSQ
339	ATI_1422_F04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYTTITVYASEGIMFYNISINYRTE IDKPSQHHHHHH
340	ATI_1422_F04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYTTITVYASEGIMFYNISINYRTP C
341	ATI_1422_F04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNSP VQEFTVYKNYATISGLKPGVDYTTITVYASEGIMFYNISINYRTP CHHHHHH
342	ATI_1422_F04–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSIPSYFISYRITYGETGGNS PVQEFTVYKNYATISGLKPGVDYTTITVYASEGIMFYNISINYRT EIDKPSQHHHHHH
343	Коровья последовательность ATI_1422_F05	EVVAATPTSLISWPYPYRGPYVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYP GQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRT
344	BC петля ATI_1422_F05	PYPYRGPYVF
345	DE петля ATI_1422_F05	YPGQ
346	FG петля ATI_1422_F05	YTSGYV
347	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPYRGPYVFYRITYGETGGNS PVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRT
348	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPYRGPYVFYRITYGETGGNS PVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTEI DKPSQHHHHHH
349	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPYRGPYVFYRITYGETGGNS PVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTEI DKPSQ
350	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPYRGPYVFYRITYGETGGNS PVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTEI DKPSQHHHHHH

351	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPRGPYVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTPC
352	ATI_1422_F05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPRGPYVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTPC HHHHHH
353	ATI_1422_F05 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWPYPRGPYVFYRITYGETGGNSPVQEFTVYPGQATISGLKPGVDYTTITVYAYTSGYVISINYRTE IDKPSQHNNHHHH
354	Коровая последовательность ATI_1422_H04	EVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT
355	BC петля ATI_1422_H04	YLPSYYVQ
356	DE петля ATI_1422_H04	KSYN
357	FG петля ATI_1422_H04	RMGVYLLSYS
358	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT
359	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT THHHHHH
360	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT TEIDKPSQ
361	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT TEIDKPSQHNNHHHH
362	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT TPC
363	ATI_1422_H04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLLSYSISINYRT TPCHHHHHH

	конец, включающий в себя PC + his-метку	
364	ATI_1422_H04 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYLPSSYYVQYRITYGETGGNSPVQEFTVKSYNATISGLKPGVDYTTITVYARMGVYLSYSISINYTEIDKPSQHNNNNH
365	Коровая последовательность ATI_1422_H05	EVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRT
366	BC петля ATI_1422_H05	QGGQLSPSF
367	DE петля ATI_1422_H05	VAGM
368	FG петля ATI_1422_H05	TSDVYFYS
369	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRT
370	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTHNNHHH
371	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTEIDKPSQ
372	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTEIDKPSQHNNNNH
373	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTPC
374	ATI_1422_H05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTPCHNNNNH
375	– полноразмерная	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQQLSPSFYRITYGETGGNSPVQEFTVVG MATISGLKPGVDYTTITVYATSDVYFYSISINYRTEIDKPSQHNNNNH
376	Коровая последовательность ATI_1422_G05	EVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSPVQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATCASVASYAFISINYRT
377	BC петля ATI_1422_G05	IAPYYSVI
378	DE петля ATI_1422_G05	TGSGY
379	FG петля ATI_1422_G05	TYCASVASYAF

380	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRT
381	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRTHHHHHH
382	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRTEIDKPSQ
383	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRTEIDKPSQHNNHHH
384	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRTPC
385	ATI_1422_G05 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISIN YRTPCHHHHHH
386	ATI_1422_G05 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP PVQEFTVTGSGYATISGLKPGVDYTTITVYATYCASVASYAFISI NYRTEIDKPSQHNNHHH
387	Коровая последовательность ATI_1760_C02	EVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSPVQEFTVPGS AYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRT
388	BC петля ATI_1760_C02	IAPYYSVI
389	DE петля ATI_1760_C02	PGSAY
390	FG петля ATI_1760_C02	SSGASIAAYAF
391	ATI_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRT
392	ATI_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRTHHHHHH
393	ATI_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность и C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRTEIDKPSQ

	хвостовая последовательность	
394	АТІ_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRTEIDKPSQHHHHHH
395	АТІ_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRTPC
396	АТІ_1760_C02 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNSP VQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISIN YRTPCHHHHHH
397	АТІ_1760_C02–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVIYRITYGETGGNS PVQEFTVPGSAYATISGLKPGVDYTTITVYASSGASIAAYAFISI NYRTEIDKPSQHHHHHH
398	Коровая последовательность АТІ_1760_E01	EVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSPVQEFTVAGA DYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRT
399	BC петля АТІ_1760_E01	IAPYYSVK
400	DE петля АТІ_1760_E01	AGADY
401	FG петля АТІ_1760_E01	TYGASIASYAF
402	АТІ_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRT
403	АТІ_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRTHHHHHH
404	АТІ_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRTEIDKPSQ
405	АТІ_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRTEIDKPSQHHHHHH
406	АТІ_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTITVYATYGASIASYAFISIN YRTPC

	модифицированный С-конец, включающий в себя РС	
407	ATI_1760_E01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNSP VQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTTVYATYGASIAAYAFISIN YRTPCHNNHHH
408	ATI_1760_E01–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYSVKYRITYGETGGNS PVQEFTVAGADYATISGLKPGVDYTTTVYATYGASIAAYAFISI NYRTEIDKPSQNNHHHH
409	Коровая последовательность ATI_1760_F01	EVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG GYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRT
410	BC петля ATI_1760_F01	IAPYYAVM
411	DE петля ATI_1760_F01	PGGGY
412	FG петля ATI_1760_F01	TGGASIAAYAF
413	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRT
414	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRTHNNHHH
415	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRTEIDKPSQ
416	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRTEIDKPSQNNHHHH
417	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRTPC
418	ATI_1760_F01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNSP VQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISIN YRTPCHNNHHH
419	ATI_1760_F01–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWIAPYYAVMYRITYGETGGNS PVQEFTVPGGGYATISGLKPGVDYTTTVYATGGASIAAYAFISI NYRTEIDKPSQNNHHHH

420	Коровая последовательность ATI_1494_D03	EVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPVQEFTVHIDY ATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT
421	BC петля ATI_1494_D03	SYPSYHL
422	DE петля ATI_1494_D03	HIDY
423	FG петля ATI_1494_D03	QSPPYDIYYE
424	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT
425	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT HHHHHH
426	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT EIDKPSQ
427	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT EIDKPSQHNNHHH
428	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT PC
429	ATI_1494_D03 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSPV QEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVRT PCHNNHHH
430	ATI_1494_D03– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSYPSYHLYRITYGETGGNSP VQEFTVHIDYATISGLKPGVDYTTITVYAQSPPYDIYYEISINVR TEIDKPSQHNNHHH
431	Коровая последовательность ATI_1494_D04	EVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQL ATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINVRT
432	BC петля ATI_1494_D04	MESSSNS
433	DE петля ATI_1494_D04	PDQL
434	FG петля ATI_1494_D04	LANAHYMRVG
435	ATI_1494_D04 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINVRT

436	АТІ_1494_D04 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYRT HHHHHH
437	АТІ_1494_D04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYRT EIDKPSQ
438	АТІ_1494_D04 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYRT EIDKPSQHNNHHH
439	АТІ_1494_D04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYRT PC
440	АТІ_1494_D04 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYRT PCHHHHHH
441	АТІ_1494_D04–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMESSSNSYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQLATISGLKPGVDYTTITVYALANAHYMRVGISINYR TEIDKPSQHNNHHH
442	Коровая последовательность АТІ_1523_A08	EVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQS ATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNI SINYRT
443	BC петля АТІ_1523_A08	ISVQTYX
444	DE петля АТІ_1523_A08	PDQS
445	FG петля АТІ_1523_A08	LEKAHYRQN
446	АТІ_1523_A08 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNI SINYRT
447	АТІ_1523_A08 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNI SINYRT HHHHHH
448	АТІ_1523_A08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNI SINYRT EIDKPSQ
449	АТІ_1523_A08 w/ N-лидерная	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTITVYALEKAHYRQNI SINYRT EIDKPSQHNNHHH

	последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	
450	АТІ_1523_А08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTTVYALEKAHYRQNIISINYRT PC
451	АТІ_1523_А08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTTVYALEKAHYRQNIISINYRT PCHNNHHH
452	АТІ_1523_А08–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWISVQTYXYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYTTTVYALEKAHYRQNIISINYRT TEIDKPSQHNNHHH
453	Коровая последовательность АТІ_1523_В10	EVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQK ATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT
454	BC петля АТІ_1523_В10	VYHYDXQ
455	DE петля АТІ_1523_В10	PDQK
456	FG петля АТІ_1523_В10	LSEAHNKRDS
457	АТІ_1523_В10 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT
458	АТІ_1523_В10 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT NNNNHH
459	АТІ_1523_В10 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT EIDKPSQ
460	АТІ_1523_В10 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT EIDKPSQHNNHHH
461	АТІ_1523_В10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя РС	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYTTTVYALSEAHNKRDSISINYRT PC

462	ATI_1523_B10 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALSEAHHKRDSISINYRTPCNNHHHH
463	ATI_1523_B10 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDXQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALSEAHHKRDSISINYRT EIDKPSQNNHHHH
464	Коровая последовательность ATI_1523_C07	EVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRT
465	BC петля ATI_1523_C07	RMHTDPD
466	DE петля ATI_1523_C07	PDQE
467	FG петля ATI_1523_C07	IQTAHYRIN
468	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRT
469	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRTNNHHHH
470	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRT EIDKPSQ
471	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRT EIDKPSQNNHHHH
472	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRTPC
473	ATI_1523_C07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRTPCNNHHHH
474	ATI_1523_C07– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRMHTDPDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQEATISGLKPGVDYITVYAIQTAHYRINISINYRT EIDKPSQNNHHHH
475	Коровая последовательность ATI_1523_D07	EVVAATPTSLISWENLASQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT

476	BC петля ATI_1523_D07	ENLASVQ
477	DE петля ATI_1523_D07	PDVQ
478	FG петля ATI_1523_D07	LPYIHMQRV
479	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT
480	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT HHHHHH
481	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT EIDKPSQ
482	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT EIDKPSQHNNHHH
483	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT PC
484	ATI_1523_D07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT PCHNNHHH
485	ATI_1523_D07 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWENLASVQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDVQATISGLKPGVDYITVYALPYIHMQRVISINYRT TEIDKPSQHNNHHH
486	Коровая последовательность ATI_1523_D08	EVVAATPTSLISWMRYDAYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQS ATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT
487	BC петля ATI_1523_D08	MRYDAY
488	DE петля ATI_1523_D08	PDQS
489	FG петля ATI_1523_D08	LEKAHYRQN
490	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT
491	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT HHHHHH

492	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT EIDKPSQ
493	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT EIDKPSQHHHHHH
494	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT PC
495	ATI_1523_D08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYRT PCHHHHHH
496	ATI_1523_D08 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWMRYDAYYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQSATISGLKPGVDYITVYALEKAHYRQNIISINYR TEIDKPSQHHHHHH
497	Коровая последовательность ATI_1523_E08	EVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPVQEFTVPDMG ATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRDSISINYRT
498	BC петля ATI_1523_E08	HHYQHYYE
499	DE петля ATI_1523_E08	PDMG
500	FG петля ATI_1523_E08	LEEAAHSRDS
501	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRDSISINYRT
502	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRDSISINYRT HHHHHH
503	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRDSISINYRT EIDKPSQ
504	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRDSISINYRT EIDKPSQHHHHHH

505	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRSSISINYRT PC
506	ATI_1523_E08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSPV QEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRSSISINYRT PCHHHHHH
507	ATI_1523_E08 – полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHHYQHYYRITYGETGGNSP VQEFTVPDMGATISGLKPGVDYITVYALEEAHSRSSISINYR TEIDKPSQHNNHHH
508	Коровая последовательность ATI_1523_F01	EVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSPVQEFTVGY NATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRT
509	BC петля ATI_1523_F01	YKPTIVT
510	DE петля ATI_1523_F01	YGYN
511	FG петля ATI_1523_F01	VHGVRF
512	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRT
513	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRTHHH HHH
514	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRTEID KPSQ
515	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRTEID KPSQHNNHHH
516	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRTPC
517	ATI_1523_F01 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPTIVTYRITYGETGGNSP VQEFTVYGYNATISGLKPGVDYITVYAVHGVRFISINYRTPCH HHHH

	конец, включающий в себя PC + his-метку	
518	ATI_1523_F01– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKPSSTIVTYRITYGETGGNS PVQEFTVYGYNATISGLKPGVDYTITVYAVHGVRFISINYRTEI DKPSQHNNHHH
519	Коровая последовательность ATI_1523_F04	EVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSPVQEFTVYQ GATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRT
520	BC петля ATI_1523_F04	GGSLSPTF
521	DE петля ATI_1523_F04	TYQG
522	FG петля ATI_1523_F04	TEGIVVYQ
523	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRT
524	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRTH NNHHH
525	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRTE IDKPSQ
526	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRTE IDKPSQHNNHHH
527	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRTP C
528	ATI_1523_F04 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNSP VQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRTP CHNNHHH
529	ATI_1523_F04 полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWGGSLSPFYRITYGETGGNS PVQEFTVYQGATISGLKPGVDYTITVYATEGIVVYQISINYRT EIDKPSQHNNHHH
530	Коровая последовательность ATI_1523_F08	EVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQK ATISGLKPGVDYTITVYALPRAHMDRSHISINYRT
531	BC петля ATI_1523_F08	VYHYDAQ
532	DE петля ATI_1523_F08	PDQK
533	FG петля ATI_1523_F08	LPRAHMDRSH

534	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT
535	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT HHHHHH
536	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT EIDKPSQ
537	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность и C-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT EIDKPSQHNNHHH
538	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT PC
539	ATI_1523_F08 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный C-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYRT PCHNNHHH
540	ATI_1523_F08–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYHYDAQYRITYGETGGNSP VQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALPRAHMDRSHISINYR TEIDKPSQHNNHHH
541	Коровая последовательность ATI_1523_G06	EVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPVQEFTVRSYA ATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT
542	BC петля ATI_1523_G06	RIKSYHK
543	DE петля ATI_1523_G06	RSYA
544	FG петля ATI_1523_G06	IMEETHLAYA
545	ATI_1523_G06 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT
546	ATI_1523_G06 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT HHHHHH
547	ATI_1523_G06 w/ N-лидерная последовательность и C-	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT EIDKPSQ

	хвостовая последовательность	
548	ATI_1523_G06 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT EIDKPSQHHHHHH
549	ATI_1523_G06 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT PC
550	ATI_1523_G06 w/ N- лидерная последовательность и модифицированный C- конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSPV QEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYRT PCHHHHHH
551	ATI_1523_G06– полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRIKSYHKYRITYGETGGNSP VQEFTVRSYAATISGLKPGVDYITVYAIMEETHLAYAISINYR TEIDKPSQHHHHHH
552	Коровая последовательность ATI_1523_G07	EVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQ ATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT
553	BC петля ATI_1523_G07	VYPQADD
554	DE петля ATI_1523_G07	PDQN
555	FG петля ATI_1523_G07	LAEHLVRIY
556	ATI_1523_G07 w/ N- лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT
557	ATI_1523_G07 w/ N- лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT HHHHHH
558	ATI_1523_G07 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT EIDKPSQ
559	ATI_1523_G07 w/ N- лидерная последовательность и C- хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT EIDKPSQHHHHHH
560	ATI_1523_G07 w/ N- лидерная последовательность и	GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVYPQADDYRITYGETGGNSPV QEFTVPDQATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT PC

	модифицированный С-конец, включающий в себя PC	
561	ATI_1523_G07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYPQADDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQNAATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT PCHNNHHH
562	ATI_1523_G07–полноразмерный	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYPQADDYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQNAATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRTEIDKPSQHHNNHH
563	Коровая последовательность ATI_1523_H07	EVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT
564	BC петля ATI_1523_H07	VYHYDAX
565	DE петля ATI_1523_H07	PDQK
566	FG петля ATI_1523_H07	LSEAHNKRDS
567	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT
568	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT HNNHHH
569	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRTEIDKPSQ
570	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность и С-хвостовая последовательность + his-метка	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRTEIDKPSQHHNNHH
571	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT PC
572	ATI_1523_H07 w/ N-лидерная последовательность и модифицированный С-конец, включающий в себя PC + his-метку	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRT PCHNNHHH
573	ATI_1523_H07–полноразмерный	GVSDVPRDLEVVAATPTSLIISWVYHYDAXYRITYGETGGNSPVQEFTVPDQKATISGLKPGVDYITVYALAEHLVRIYISINYRTEIDKPSQHHNNHH

574	N-концевая лидерная последовательность	MGVSDVPRDL
575	N-концевая лидерная последовательность	GVSDVPRDL
576	N-концевая лидерная последовательность	X _n SDVPRDL
577	N-концевая лидерная последовательность	X _n DVPRDL
578	N-концевая лидерная последовательность	X _n VPRDL
579	N-концевая лидерная последовательность	X _n PRDL
580	N-концевая лидерная последовательность	X _n RDL
581	N-концевая лидерная последовательность	X _n DL
582	N-концевая лидерная последовательность	MASTSG
583	N-концевая лидерная последовательность	METDTLLWVLLWVPGSTG
584	C-концевая хвостовая последовательность	EIEK
585	C-концевая хвостовая последовательность	EGSGC
586	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPCQ
587	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPSQ
588	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKP
589	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPS
590	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPC
591	C-концевая хвостовая последовательность	EIDK
592	C-концевая хвостовая последовательность	EIDKPCQ
593	C-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQ
594	C-концевая хвостовая последовательность	EIEPKSS
595	C-концевая хвостовая последовательность	EIDKPC
596	C-концевая хвостовая последовательность	EIDKP
597	C-концевая хвостовая последовательность	EIDKPS

598	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQLE
599	С-концевая хвостовая последовательность	EIEDEDEDEDED
600	С-концевая хвостовая последовательность	EGSGS
601	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPCQLE
602	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQHHHHHH
603	С-концевая хвостовая последовательность	GSGCHHHHHH
604	С-концевая хвостовая последовательность	EGSGCHHHHHH
605	С-концевая хвостовая последовательность	PIDK
606	С-концевая хвостовая последовательность	PIEK
607	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKP
608	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKP
609	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPS
610	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPS
611	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPC
612	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPC
613	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPSQ
614	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPSQ
615	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPCQ
616	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPCQ
617	С-концевая хвостовая последовательность	PHHHHH
618	С-концевая хвостовая последовательность	PSHHHHH
619	6X-His метка	HHHHHH
620	Fc-домен человеческого IgG1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK
621	Коровый шарнирный участок Fc	DKTHTCPPCPAPELLG

622	Иллюстративная шарнирная последовательность	EPKSSDKTHTCFPCPAPELLGGPS
623	Иллюстративная шарнирная последовательность	EPKSSDKTHTCFPCPAPELLGGSS
624	Иллюстративная шарнирная последовательность	EPKSSGSTHTCFPCPAPELLGGSS
625	Иллюстративная шарнирная последовательность	DKTHTCFPCPAPELLGGPS
626	Иллюстративная шарнирная последовательность	DKTHTCFPCPAPELLGGSS
627	Fc с CH2 и CH3 участками из IgG1 конструктора аднектин-шарнир-Fc	VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
628	Fc с CH2 и CH3 участками из IgG1 для конструктора Fc-шарнир-аднектин	VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
629	Линкер 1	GAGGGGSG
630	Линкер 2	EPKSSD
631	Линкер 3	PVGVV
632	Линкер 4	ESPKAQASSVPTAQPAEGLA
633	Линкер 5	ELQLEESAAEAQDGELD
634	Линкер 6	GQDEPGGS
635	Линкер 7	GGSGSGSGSGSGS
636	Линкер 8	ELQLEESAAEAQEGELE
637	Линкер 9	GSGSG
638	Линкер 10	GSGC
639	Линкер 11	AGGGGSG
640	Линкер 12	GSGS
641	Линкер 13	QPDEPGGS
642	Линкер 14	GSGSGS
643	Линкер 15	TVAAPS
644	Линкер 16	KAGGGGSG
645	Линкер 17	KSGSGSGSGSGSGS
646	Линкер 18	KQDEPGGS
647	Линкер 19	KELQLEESAAEAQDGELD
648	Линкер 20	KTVAAPS
649	Линкер 21	KAGGGGSGG
650	Линкер 22	KSGSGSGSGSGSGSG
651	Линкер 23	KQDEPGGSG
652	Линкер 24	KELQLEESAAEAQDGELDG
653	Линкер 25	KTVAAPSG
654	Линкер 26	AGGGGSGG

655	Линкер 27	AGGGGSG
656	Линкер 28	GGSGSGSGSGSGSG
657	Линкер 29	QPDFGGSG
658	Линкер 30	TVAAPSG
659	Линкер 31	PSTSTST
660	Линкер 32	ETDKPSQ
661	Линкер 33	GGSGSGSG
662	Линкер 34	GGSGSGSGSG
663	Линкер 35	GGSGSGSGSGSG
664	Линкер 36	GGSGSGSGSGSGSG
665	Линкер 37	GGSGSGSGSGSGSG
666	Линкер 38	GGSGSGSGSGSGSGSG
667	Линкер 39	GSEGSSEGSSEGSSE
668	Линкер 40	GGSEGGSE
669	Линкер 41	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
670	Линкер 42	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
671	Линкер 43	GGGGSGGGSGGGSGGGSG
672	Линкер 44	GPFGPFG
673	Линкер 45	GPFGPFGPFG
674	Линкер 46	PAPAPA
675	Линкер 47	PAPAPAPAPAPA
676	Линкер 48	PAPAPAPAPAPAPAPAPA
677	Линкер 49	GGSGSGSGSGSGSGSGSGSG
678	Линкер 50	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG

Эквиваленты

Специалист в данной области техники поймет или будет способен определить многие эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов осуществления с использованием не более чем стандартного экспериментирования. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующими пунктами формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина типа III ($^{10}\text{Fn3}$), причем
 - $^{10}\text{Fn3}$ домен содержит AB, BC, CD, DE, EF и FG петли и аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную не относящимся к петлевым участкам с SEQ ID NO: 1,
 - BC, DE и FG петли в $^{10}\text{Fn3}$ домене содержат аминокислотные последовательности:
 - SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно;
 - SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;
 - SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно;
 - SEQ ID NO: 51, 52 и 53 соответственно;
 - SEQ ID NO: 66, 67 и 68 соответственно;
 - SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно;
 - SEQ ID NO: 97, 98 и 99 соответственно;
 - полипептид специфично связывается с человеческим PD-L1.
- Полипептид по п.1, причем полипептид связывается с PD-L1 с K_D , составляющей 500 мМ или менее.
- Полипептид по п.2, причем полипептид связывается с PD-L1 с K_D , составляющей 100 мМ или менее.
- Полипептид по п.1, причем аминокислотная последовательность, не относящаяся к BC, DE и FG петлям $^{10}\text{Fn3}$ домена является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98%, 99% или 100% идентичной не относящимся к BC, DE и FG петлевым участкам любой из SEQ ID NO: 5, 20, 35, 50, 65, 80 и 96.
- Полипептид по п.1, причем аминокислотная последовательность, не относящаяся к BC, DE и FG петлям $^{10}\text{Fn3}$ домена, является по меньшей мере на 90, 95, 98, 99 или 100% идентичной не относящимся к BC, DE и FG петлевым участкам любой из SEQ ID NO: 9-15, 24-30, 39-45, 54-60, 69-75, 84-91 и 100-105 и 107.
- Полипептид по п.1, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 5, 20, 35, 50, 65, 80, 96.
- Полипептид по п.6, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.
- Полипептид по п.6, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.
- Полипептид по любому из пп.1-8, причем полипептид содержит N-концевую лидерную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 574-583, и/или C-концевую хвостовую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 584-618.
- Полипептид по любому из пп.1-9, причем полипептид дополнительно содержит один или несколько фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc домена иммуноглобулина или его фрагмента, трансферрина, сывороточного

альбумина, и белка, связывающегося с сывороточным альбумином, где белок, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой антитело или аднектин.

11. Полипептид по п.10, в котором РК-фрагмент и полипептид связаны посредством линкера с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 629-678.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-11.

13. Нуклеиновая кислота по п.12, причем нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-19, 31-34, 46-49, 61-64, 76-79, 92-95 и 108-111.

14. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.13.

15. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.12 для получения полипептида по любому из пп.1-11.

16. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Визуализирующее средство, содержащее полипептид по любому из пп.1-11 и выявляемую метку.

18. Визуализирующее средство по п.17, причем выявляемая метка может быть выявлена с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

19. Визуализирующее средство по п.17 или 18, причем полипептид конъюгирован с выявляемой меткой с помощью конъюгирующего фрагмента.

20. Визуализирующее средство по п.19, причем конъюгирующий фрагмент представляет собой NODAGA.

21. Визуализирующее средство по любому из пп.17-20, причем выявляемая метка представляет собой радионуклид.

22. Визуализирующее средство по п.21, причем радионуклид выбран из группы, состоящей из ^{64}Cu , ^{124}I , $^{76/77}\text{Br}$, ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{32}Cl , ^{33}Cl , ^{34}Cl , ^{74}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{78}Br , ^{89}Zr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{99}Tc или ^{153}Sm .

23. Визуализирующее средство по п.22, причем радионуклид представляет собой ^{18}F .

24. Визуализирующее средство по п.22, причем радионуклид представляет собой ^{64}Cu .

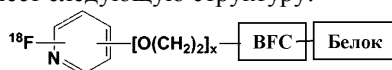
25. Визуализирующее средство по п.22, причем конъюгирующий фрагмент представляет собой NODAGA и радионуклид представляет собой ^{64}Cu .

26. Визуализирующее средство по п.25, причем визуализирующее средство содержит полипептид по любому из пп.1-14, NODAGA и радионуклид ^{64}Cu .

27. Визуализирующее средство по п.25, причем визуализирующее средство содержит полипептид по п.7, NODAGA и радионуклид ^{64}Cu .

28. Визуализирующее средство по п.25, причем визуализирующее средство содержит полипептид по п.8, NODAGA и радионуклид ^{64}Cu .

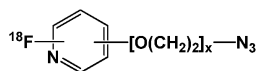
29. Визуализирующее средство, содержащее полипептид по любому из пп.1-11, меченую радиоактивным изотопом ^{18}F простетическую группу и бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент, причем визуализирующее средство имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

(a) ^{18}F находится во втором положении пиридинового кольца и x представляет собой целое число от 1 до 8;

(b) фрагмент BFC ковалентно связан с меченной радиоактивным изотопом ^{18}F простетической группой, где ковалентная связь образована 1,3-диполярным циклоприсоединением между азидом со следующей структурой:



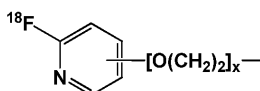
и циклооктиновой группой BFC,

(c) BFC содержит спейсерный фрагмент полиэтиленгликоля (PEG) $_y$, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где спейсерный фрагмент (PEG) $_y$ содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминной, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой белка; и

(d) белок представляет собой полипептид по любому из пп.1-11,

или его фармацевтически приемлемая соль.

30. Визуализирующее средство по п.29, причем меченная радиоактивным изотопом ^{18}F простетическая группа имеет следующую структуру:



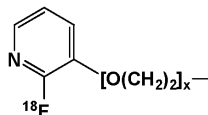
31. Визуализирующее средство по п.29 или 30, причем фрагмент $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ присутствует в конфи-

гурации 1-3 относительно азота в пиридиновом кольце.

32. Визуализирующее средство по п.29 или 30, причем фрагмент $[O(CH_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-2 относительно азота в пиридиновом кольце.

33. Визуализирующее средство по п.29 или 30, причем фрагмент $[O(CH_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-4 относительно азота в пиридиновом кольце.

34. Визуализирующее средство по п.29, причем меченная радиоактивным изотопом ^{18}F простетическая группа имеет следующую структуру:



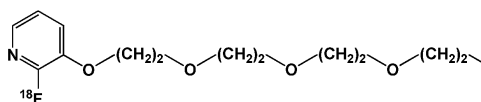
35. Визуализирующее средство по любому из пп.29-34, причем x представляет собой целое число от 2 до 6.

36. Визуализирующее средство по п.35, причем x представляет собой целое число от 3 до 5.

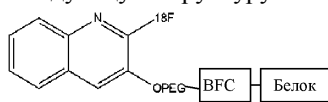
37. Визуализирующее средство по п.35, причем x равно 4.

38. Визуализирующее средство по любому из пп.29-37, причем фрагмент $[O(CH_2)_2]_x$ присутствует в конфигурации 1-3 относительно азота в пиридиновом кольце.

39. Визуализирующее средство по п.29, причем меченная радиоактивным изотопом ^{18}F простетическая группа имеет структуру



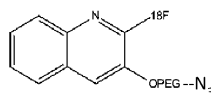
40. Визуализирующее средство, содержащее полипептид по любому из пп.1-11, меченную радиоактивным изотопом ^{18}F простетическую группу и бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент, причем визуализирующее средство имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, причем

(a) "OPEG" представляет собой $[O(CH_2)_2]_x$ и x представляет собой целое число от 1 до 8,

(b) фрагмент BFC образует ковалентную связь с меченной радиоактивным изотопом ^{18}F простетической группой путем 1,3-диполярного циклоприсоединения между азидом со следующей структурой:



и циклооктиновой группой BFC;

(c) BFC содержит спейсерный фрагмент полиэтиленгликоля (PEG)_y, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где спейсерный фрагмент (PEG)_y содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминной, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой белка, и

(d) "белок" представляет собой полипептид по любому из пп.1-11.

41. Визуализирующее средство по п.40, причем x представляет собой целое число от 2 до 6, или его фармацевтически приемлемая соль.

42. Визуализирующее средство по п.40, причем x представляет собой целое число от 3 до 5, или его фармацевтически приемлемая соль.

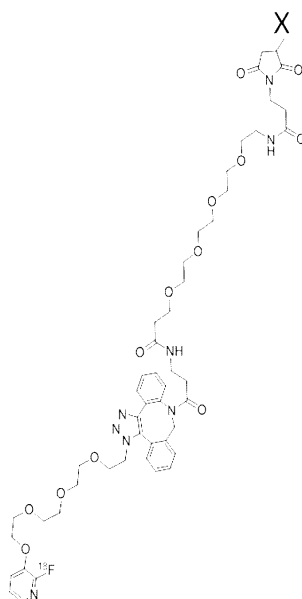
43. Визуализирующее средство по п.40, причем x равно 4, или его фармацевтически приемлемая соль.

44. Визуализирующее средство по любому из пп.29-43, где BFC является агентом на основе дибензоциклооктина.

45. Визуализирующее средство по п.44, где агент на основе дибензоциклооктина представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир, DBCO-сульфо-NHS-сложный эфир, DBCO-PEG4-кислоту, DBCO-PEG4-амин или DBCO-PEG4-малеимид.

46. Визуализирующее средство по п.45, причем BFC представляет собой DBCO-PEG4-малеимид.

47. Визуализирующее средство по п.29, причем визуализирующее средство имеет структуру



причем X представляет собой полипептид по любому из пп.1-11 и причем малеимидная группа BFC ковалентно связана с тиольной группой в цистеиновом остатке полипептида.

48. Визуализирующее средство по п.47, причем X представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 13, 28, 43, 58, 73, 88 и 104.

49. Визуализирующее средство по п.47 или 48, причем малеимидная группа BFC ковалентно связана с тиольной группой на С-концевом цистеиновом остатке полипептида.

50. Визуализирующее средство по любому из пп.17-49, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 88.

51. Визуализирующее средство по любому из пп.17-49, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 104.

52. Визуализирующее средство по п.47, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

53. Визуализирующее средство по п.47, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 104.

54. Композиция, содержащая визуализирующее средство по любому из пп.17-53, для детекции клеток, экспрессирующих PD-L1.

55. Способ получения изображения визуализирующего средства по любому из пп.17-53, причем способ включает:

а) введение субъекту визуализирующего средства и

б) визуализацию *in vivo* распространения визуализирующего средства с помощью позитронно-эмиссионной томографии,

причем детекция визуализирующего средства является показателем распределения *in vivo* экспрессирующих PD-L1 клеток у субъекта.

56. Способ диагностики наличия экспрессирующей PD-L1 опухоли у субъекта, причем способ включает:

(а) введение визуализирующего средства по любому из пп.17-53 субъекту и

(б) получение сформированного за счет радиоактивного излучения изображения по меньшей мере части субъекта для выявления наличия или отсутствия визуализирующего средства;

причем наличие и положение визуализирующего средства на уровне выше фонового является показателем наличия и положения экспрессирующей PD-L1 опухоли.

57. Способ мониторинга прогресса противоопухолевой терапии в отношении PD-L1-экспрессирующей опухоли у субъекта, причем способ включает:

(а) введение визуализирующего средства по любому из пп.17-53 субъекту в первый момент времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения размера опухоли;

(б) назначение субъекту противоопухолевой терапии;

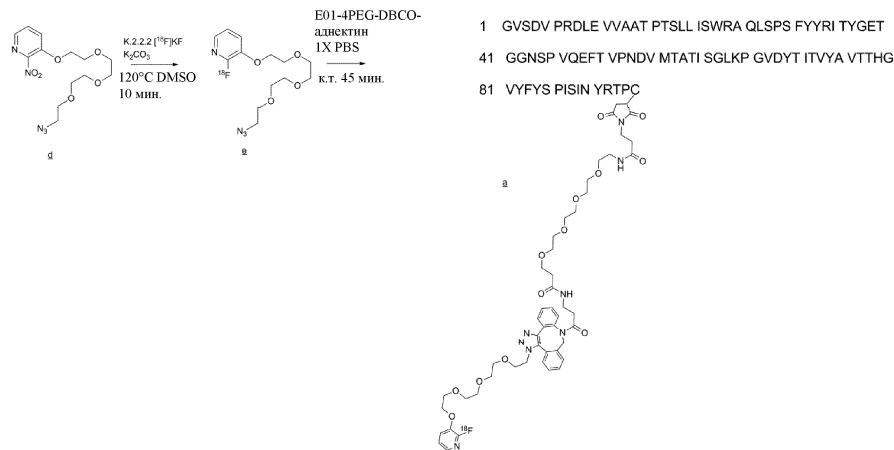
(с) введение визуализирующего средства субъекту в один или несколько последующих моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени;

причем размер и положение опухоли в каждый момент времени являются показателями прогресса противоопухолевой терапии против экспрессирующей PD-L1 опухоли.

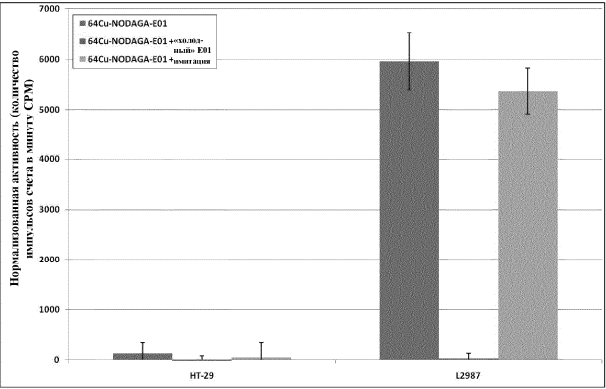
Коровые последовательности

WT	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT
ATI-968	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWIAFFYNVIYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGTGYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTDGASIASYAFFPIISINYRT
ATI-964	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWSYDGSIERYYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYTIITVYAVRLEEAAHYRESPIISINYRT
ATI-967	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWQQQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFTVPPASGTATISGLKPGVDYTIITVYAVTSHGIYFAPISINYRT
A02	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFTVPPDQKTATISGLKPGVDYTIITVYAVRLEEAAHYNREFPIISINYRT
E01	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFTVPNDVMTATISGLKPGVDYTIITVYAVTTHGVYFYSPIISINYRT
ATI-965	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWTAYDSVDKYRITYGETGGNSPVQEFTVGP RHHTATISGLKPGVDYTIITVYAVYHTEPGYHAHMPISINYRT
ATI-966	VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWHRFSSIMAYRITYGETGGNSPVQEFTVAGSVNTATISGLKPGVDYTIITVYAVTIHNVSFPISINYRT

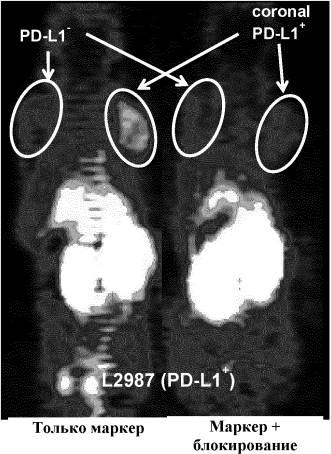
Фиг. 1



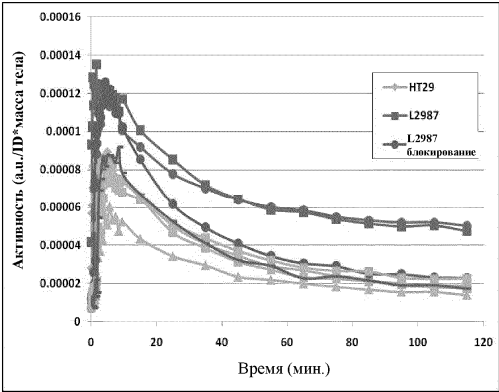
Фиг. 2



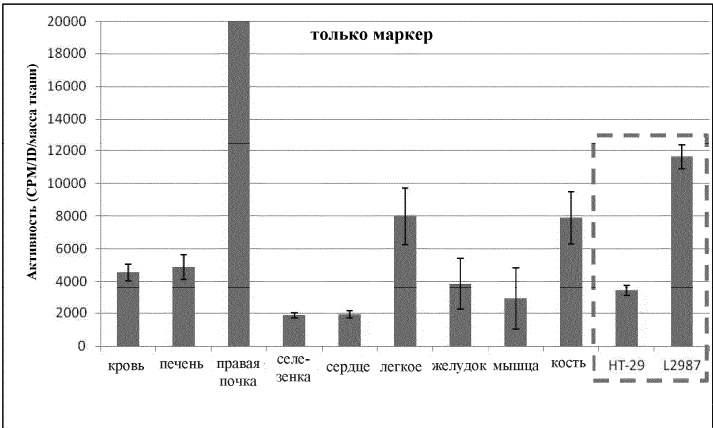
Фиг. 3



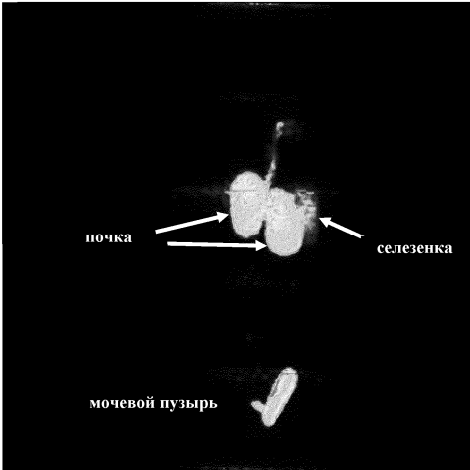
Фиг. 4А



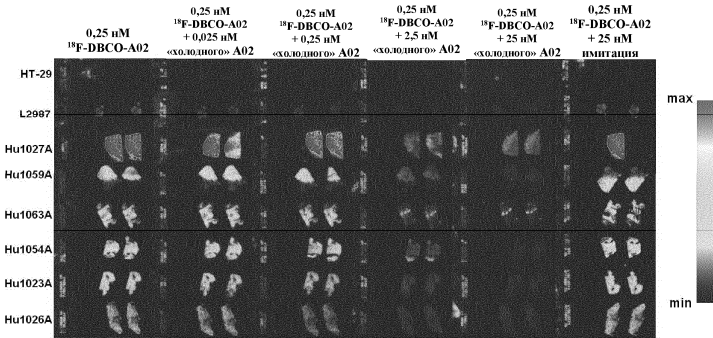
Фиг. 4В



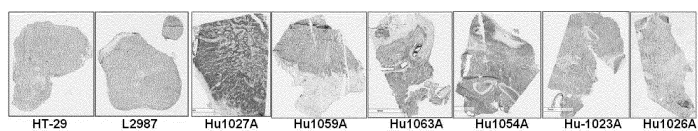
Фиг. 5



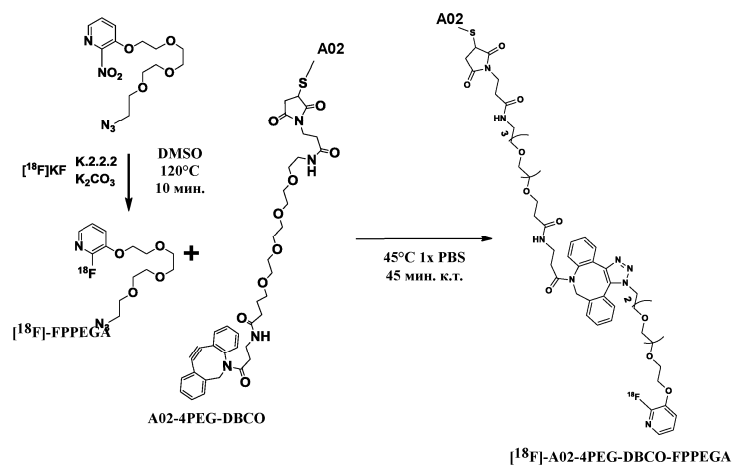
Фиг. 6



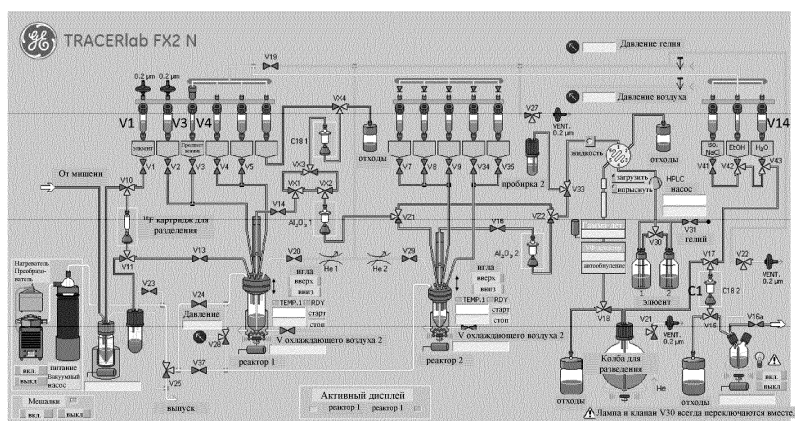
Фиг. 7



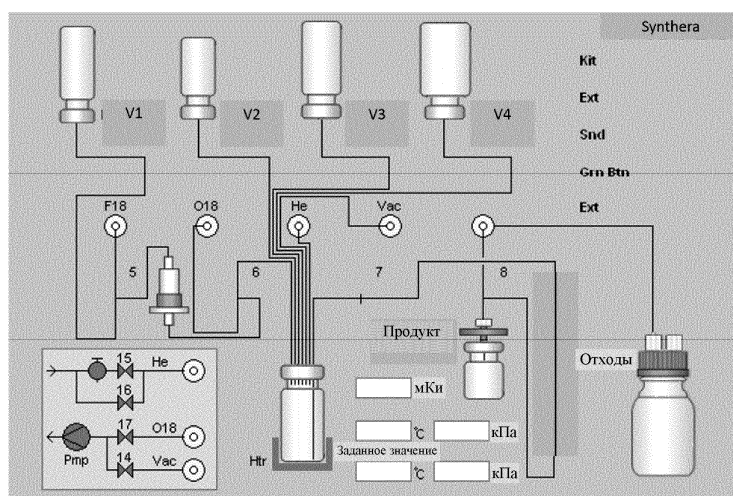
Фиг. 8



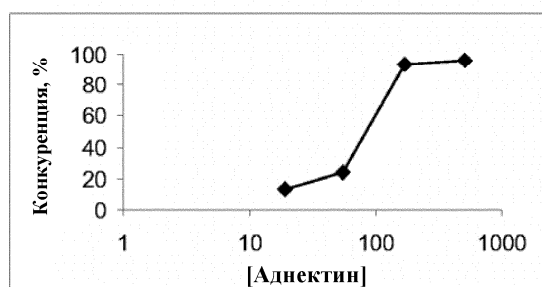
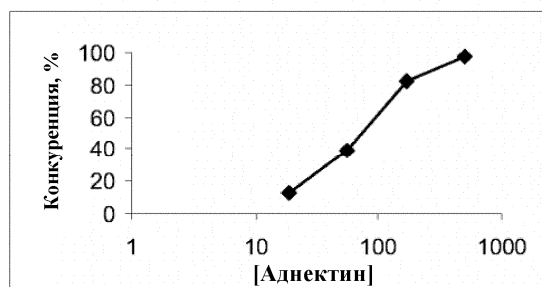
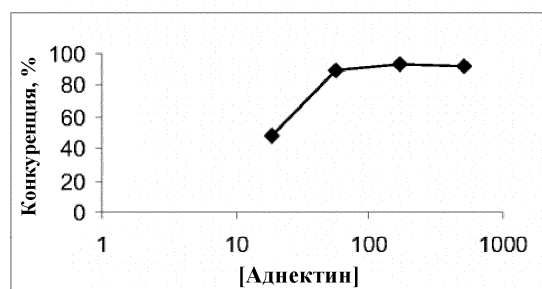
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

