



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.18

(21) Номер заявки
201992349

(22) Дата подачи заявки
2018.04.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) FGFR3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

(31) 17164482.6

(32) 2017.04.03

(33) EP

(43) 2020.02.17

(86) PCT/EP2018/058390

(87) WO 2018/185050 2018.10.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЦИЛАГ ГМБХ ИНТЕРНЭШНЛ (CH)

(72) Изобретатель:
**Силакси Мелкко Михаэла, Вудз
Ричард, Хенне Патрисия, Зюблер
Барбара, Каге Елена, Грабуловски
Драган, Бертсингер Юлиан (NL)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) WO-A1-2010111367
MARTINEZ-TORRECUADRADA ET AL.:
"Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor
3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model
of bladder carcinoma is mediated by apoptosis", MOL
CANCER THER, vol. 7, no. 4, 2008, pages 862-873,
XP055030467, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0394
cited in the application the whole document

MARTINEZ-TORRECUADRADA ET AL.:
"Targeting the Extracellular Domain of Fibroblast Growth
Factor Receptor 3 with Human Single-Chain Fv Antibodies
Inhibits Bladder Carcinoma Cell Line Proliferation", CLIN
CANCER RES, vol. 11, no. 17, 2005, pages 6280-6290,
XP003013913, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0282
cited in the application the whole document

WENHUI WANG ET AL: "Screening a phage
display library for a novel FGF8b-binding peptide with anti-
tumor effect on prostate cancer", EXPERIMENTAL CELL
RESEARCH, vol. 319, no. 8, 1 May 2013 (2013-05-01),
pages 1156-1164, XP055405147, AMSTERDAM, NL
ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.02.007 the
whole document

CLAIRE DUNOIS-LARD ET AL: "Absence of
FGFR3 mutations in urinary bladder tumours of rats and
mice treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine"
MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 42, no. 3, 2
February 2005 (2005-02-02), pages 142-149, XP055198881,
US ISSN: 0899-1987, DOI: 10.1002/mc.20075 the whole
document

HAIPING ZHOU ET AL: "FGFR3b Extracellular
Loop Mutation Lacks Tumorigenicity In Vivo but
Collaborates with p53/pRB Deficiency to Induce High-grade
Papillary Urothelial Carcinoma", SCIENTIFIC REPORTS,
vol. 6, no. 1, 9 May 2016 (2016-05-09), XP055405140, DOI:
10.1038/srep25596 the whole document

YAN ZHANG ET AL: "Constitutive activating
mutation of the FGFR3b in oral squamous
cell carcinomas", INTERNATIONAL JOURNAL OF
CANCER, vol. 117, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01),
pages 166-168, XP055405150, US ISSN: 0020-7136,
DOI:10.1002/ijc.21145 the whole document

T. C. HARDING ET AL: "Blockade of
Nonhormonal Fibroblast Growth Factors by FP-1039
Inhibits Growth of Multiple Types of Cancer", SCIENCE
TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 5, no. 178, 178RA39,
27 March 2013 (2013-03-27), pages 1-9, XP055405145,
ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.3005414 the
whole document

BERNARD-PIERROT I ET AL: "Oncogenic
properties of the mutated forms of fibroblast growth
factor receptor 3b", CARCINOGENESIS, vol. 27, no. 4, 1
January 2006 (2006-01-01), pages 740-747, XP002445932,
OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB ISSN: 0143-3334,
DOI: 10.1093/CARCIN/BGI290 the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к полипептиду, связывающемуся с изоформами 3b и 3с рецептора 3 фактора роста фибробластов (FGFR3b и FGFR3с), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (a) GVTLFVALYDYEVYGGPTPLMSFHKGEKQIL (X¹) (X²) (X³) (X⁴) GPYWEARSL (X⁵) TGETG (X⁶) IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), где аминокислотные положения от (X¹) до (X⁶) могут представлять собой любую аминокислотную последовательность; (b) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (a), где при определении идентичности исключаются аминокислотные

положения от (X^1) до (X^6), и при условии, что аминокислотная последовательность EVYGTPM (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1 является консервативной, и аминокислоты Р и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1 являются консервативными; (с) GVTLFVALYDYEVMS TTALSFHKGEKFQILSQSPHGQYWEARSLTTGETG (X^6) IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 19), где аминокислотное положение (X^6) может представлять собой любую аминокислоту; (d) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (с), где при определении идентичности исключается аминокислотное положение (X^6), и при условии, что аминокислотные последовательности EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными, и аминокислоты Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными.

042136 B1

042136 B1

Предпосылки к созданию изобретения

FGFR3 является одним из четырех представителей семейства FGFR трансмембранных тирозинкиназных рецепторов, которые принимают участие во внутриклеточных сигнальных путях. Было показано, что активация FGFR посредством взаимодействия с факторами роста фибробластов (FGF) играет важную роль как в эмбриогенезе, так и у взрослых с плеiotропным спектром последствий, в том числе пролиферацией и выживаемостью клеток, их миграцией, дифференцировкой и задержкой роста [1].

Молекулы FGFR состоят из внеклеточной лигандсвязывающей области с двумя или тремя иммуноглобулиноподобными доменами (IgD1-3), однопроходной трансмембранной областью и цитоплазматическим расщепленным тирозинкиназным доменом.

У людей передача сигналов осуществляется с помощью 1 из 22 лигандов FGF, и специфичность рецептора в отношении лиганда контролируется дифференциальной клеточной экспрессией рецепторов, секрецией белков клеточной поверхности, которые модулируют взаимодействие и альтернативный сплайсинг этих рецепторов [1]. Каждый из FGFR1, 2 и 3 имеет две основные, получаемые в результате альтернативного сплайсинга изоформы, обозначенные IIIb и IIIc. Эти изоформы отличаются приблизительно 50 аминокислотами во второй половине IgD3 и имеют различное распределение в тканях и различную специфичность в отношении лиганда. Лиганды FGF обуславливают димеризацию FGFR, что приводит к активации и фосфорилированию внутриклеточного тирозинкиназного домена. Это приводит к активации нескольких ключевых путей, участвующих в передаче онкогенных сигналов, в том числе путей с участием митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и PI3K-AKT.

Аберрантно активированные FGFR принимают участие в развитии отдельных злокачественных новообразований у человека [2]. В частности, у приблизительно 15-20% пациентов с множественной миеломой встречается хромосомная транслокация t(4;14) (p16.3;q32), которая приводит к сверхэкспрессии FGFR3 и коррелирует с более короткой общей выживаемостью [2]. FGFR3 также принимает участие в придании клеточным линиям миеломы в культуре устойчивости к химическому воздействию [3], что согласуется со слабым клиническим ответом у t(4; 14) пациентов на традиционную химиотерапию [4]. Сверхэкспрессии активированного в результате мутации FGFR3 достаточно для индукции онкогенной трансформации гематопозитических клеток и фибробластов [5-8] у трансгенных мышинных моделей [9] и у мышинных моделей трансплантации костного мозга [9, 10].

Соответственно, FGFR3 был предложен в качестве потенциальной терапевтической мишени при множественной миеломе. Действительно, для нескольких низкомолекулярных ингибиторов, нацеленных на FGFR, хотя и не селективных в отношении FGFR3 и обладающих перекрестной ингибирующей активностью в отношении некоторых других киназ, была продемонстрирована цитотоксичность в отношении FGFR3-положительных клеток миеломы в культуре и у мышинных моделей [11-15].

Сверхэкспрессия FGFR3 также была задокументирована у высокой доли случаев рака мочевого пузыря [16, 17]. Кроме того, соматические активирующие мутации в FGFR3 были выявлены в 60-70% случаев папиллярной и в 16-20% случаев мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря [17, 18]. В экспериментах с клеточными культурами РНК-интерференция [19] или однопочечный Fv-фрагмент антитела к FGFR3 ингибировали пролиферацию клеток рака мочевого пузыря [20]. Недавнее исследование продемонстрировало, что конъюгат антитела к FGFR3 и токсина ослабляет рост ксенотрансплантата линии клеток рака мочевого пузыря за счет FGFR3-опосредованной доставки токсина в опухоли [21]. Публикации, имеющие отношение к FGFR3 и антителам к FGFR3, включают US 2005/0147612; WO 2010/111367; Rauchenberger et al, J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003)[22]; WO 2006/048877; Martinez-Torrecuadrada et al, (2008) Mol Cancer Ther 7(4): 862-873; WO 2007/144893; Trudel et al. (2006) 107(10): 4039-4046; Martinez-Torrecuadrada et al (2005) Clin Cancer Res 11 (17): 6280-6290; Gomez-Roman et al (2005) Clin Cancer Res 11:459-465 и WO 2010/002862.

Эти антитела характеризуются одним или несколькими из следующих недостатков: они обладают способностью распознавать лишь одну из изоформ или демонстрируют значительную разницу в значениях аффинности к различным изоформам.

Таким образом, остается потребность в молекулах, которые могут связывать оба сплайс-варианта FGFR3b и FGFR3c с высокой аффинностью и специфичностью и которые, в то же время, способны хорошо интернализироваться в клетку. Эта потребность осуществляется с помощью настоящего изобретения.

Описание изобретения

По результатам нескольких различных скринингов был выявлен набор финомерных полипептидов с неожиданным сочетанием свойств, в том числе высокой аффинностью как к FGFR3b, так и к FGFR3c и способностью к хорошей интернализации в клетки, причем этот набор полипептидов превзошел большое количество других кандидатов в отношении комбинации этих свойств. В данном документе раскрыты последовательности этих полипептидов. Помимо самих полипептидов, настоящим изобретением также предусмотрены слитые конструкции, содержащие такие полипептиды, в том числе их слияния с антителами. Настоящим изобретением дополнительно предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды или слитые конструкции по настоящему изобретению. Дополнительно предусмотрены фармацевтические или диагностические композиции, содержащие полипептиды или слитые конст-

рукции по настоящему изобретению, а также такие фармацевтические композиции для применения в лечении рака или опосредованных Т-клетками заболеваний.

Настоящее изобретение относится в первом аспекте к полипептиду, связывающемуся с изоформами 3b и 3c рецептора 3 фактора роста фибробластов (FGFR3b и FGFR3c), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (a) GVTLFVALYDYEVYGPTRPMLSFHKGEKQIL (X^1) (X^2) (X^3) (X^4) GPYWEARSL (X^5) TGETG (X^6) IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), где аминокислотные положения от (X^1) до (X^6) могут представлять собой любую аминокислотную последовательность; (b) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (a), где при определении идентичности исключаются аминокислотные положения от (X^1) до (X^6), и при условии, что аминокислотная последовательность EVYGPTRM (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1 является консервативной, и аминокислоты P и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1 являются консервативными; (c) GVTLFVALYDYEVMSSTALSFSHKGEKQILSQSPHGYWEARSLTTGETG (X^6) IPSNYVAPVDS IQ (SEQ ID NO: 19), где аминокислотное положение (X^6) может представлять собой любую аминокислоту; (d) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (c), где при определении идентичности исключается аминокислотное положение (X^6), и при условии, что аминокислотные последовательности EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными, и аминокислоты Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными.

Используемый в данном документе термин "полипептид" описывает линейные молекулярные цепи из аминокислот, в том числе одноцепочечные белки или их фрагменты, содержащие более чем приблизительно 60 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно формировать мультимеры, например олигомеры, состоящие из по меньшей мере двух одинаковых или различных молекул. Соответствующие структуры более высокого порядка таких мультимеров, соответственно, называют гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Более того, пептидомиметики таких полипептидов, у которых аминокислота(ы) и/или пептидная(ые) связь(и) были заменены функциональными аналогами, также охватываются настоящим изобретением. Такие функциональные аналоги включают все известные аминокислоты, кроме 20 аминокислот, закодированных в генах, таких как селеноцистеин. Термин "полипептид" также относится к природным образом модифицированным полипептидам, где модификация осуществляется, например, с помощью гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и схожих модификаций, которые хорошо известны из уровня техники.

Полипептид по настоящему изобретению представляет собой Fyn SH3-производный полипептид или финомер. Fyn SH3-производные полипептиды или финомеры хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196-3204; WO 2008/022759; Bertschinger et al (2007) Protein Eng Des Sel 20(2): 57-68 и Gebauer and Skerra (2009) Curr Opinion in Chemical Biology 13: 245-255. Термин "Fyn SH3-производный полипептид", используемый в данном документе взаимозаменяемо с термином "финомер", относится к не являющемуся производным иммуноглобулина связывающему полипептиду (например, так называемый остов, который описан в Gebauer and Skerra (2009) Curr Opinion in Chemical Biology 13: 245-255), полученному из SH3-домена Fyn человека. Финомеры представляют собой небольшие глобулярные полипептиды размером приблизительно 7 кДа. SH3-домен киназы Fyn человека успешно использовался для конструирования белков (Fyn SH3-производных связывающих белков, называемых финомерами), которые с высокой аффинностью и специфичностью связываются с различными целевыми белками (WO 2008/022759, WO 2011/023685, WO 2013/135588, WO 2014/170063, Grabulovski D. et al., (2007) J Biol Chem 282, p. 3196-3204, Bertschinger J. et al. (2007) Protein Eng Des Sel, 20, p.57-68 и Schlatter et al. (2012) mAbs, 4(4) p. 497-50).

Фраза "связывающийся с изоформами 3b и 3c рецептора 3 фактора роста фибробластов" (FGFR3b и FGFR3c или FGFR3b и 3c) при использовании означает, что полипептиды по настоящему изобретению формируют связывающие взаимодействия (in vivo и/или in vitro) с FGFR3b и FGFR3c. Изоформы 3b (FGFR3b) и 3c (FGFR3c) образуются в результате альтернативного сплайсинга. Сплайс-варианты получают с помощью двух альтернативных экзонов, 3b и 3c, кодирующих С-концевую половину домена 3 Ig. В эпителиальных клетках наблюдаются исключительно транскрипты 3b, тогда как в фибробластных клетках наблюдается смесь транскриптов 3b и 3c. Аминокислотная последовательность FGFR3b показана под SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность FGFR3c показана под SEQ ID NO: 10. Полипептиды по настоящему изобретению предпочтительно связываются с изоформами 3b и 3c рецептора 3 фактора роста фибробластов человека. Предпочтительно, полипептиды по настоящему изобретению связываются с обеими изоформами, FGFR3b и FGFR3c, с K_D от 10^{-7} до 10^{-12} М, более предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-12} М, наиболее предпочтительно от 10^{-9} до 10^{-12} М. В этой связи предпочтительно, чтобы полипептиды по настоящему изобретению специфически связывались с FGFR3, предпочтительно специфически с обеими изоформами FGFR3b и FGFR3c и, следовательно, существенно не связывались с другими родственными белками, такими как FGFR1, FGFR2 или FGFR4. В данном отношении существенное связывание предпочтительно означает связывание с $K_D > 5 \times 10^{-6}$ М.

SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 19, которые показаны выше в данном документе, являются производными от аминокислотной последовательности SH3-домена киназы Fyn человека (SEQ ID NO: 11; аминокисл. 83-145 киназы Fyn, о которых сообщали Kawakami et al. и Semba et al. в 1986 году). SEQ ID NO: 11 имеет следующую форму

GVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFKQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ

(SEQ ID NO: 11). В SEQ ID NO: 11, которая показана выше, последовательности RT и петли src соответственно подчеркнуты и дважды подчеркнуты. Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196-3204, исследовали влияние мутаций в петлях RT и src SH3-доменов Fyn и продемонстрировали, что мутации в этих петлях, которые являются смежными с гидрофобной поверхностью, могут определять способность этого домена принимать участие в межмолекулярных связях. Более того, в EP 2054432 показано, что мутации в RT и/или петле src и смежно с ними определяют специфичность связывания SH3-домена. Аминокислотная последовательность SH3-домена Fyn полностью консервативна у человека, мыши, крысы и обезьяны (гиббона). SH3 Fyn курицы отличается одним, а у *Xenopus laevis* двумя аминокислотными положениями от соответствующего домена человека. Как и другие SH3-домены, SH3-домен Fyn состоит из двух антипараллельных β -листов и содержит две гибкие петли (называемые RT- и src-петлями) для взаимодействия с другими белками.

Более подробно, SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность, полученную в результате выравнивания SEQ ID NO: 3-8 (см. фиг. 1). Как видно из фиг. 1, положения от (X^1) до (X^4) из SEQ ID NO: 1 соответствуют src-петле SH3-домена киназы Fyn из SEQ ID NO: 11. Среди SEQ ID NO 3-8 аминокислоты в src-петле отличаются друг от друга. С другой стороны, второе и третье положение в направлении C-конца относительно src-петли представляют собой "DW" в последовательности дикого типа, тогда как соответствующие аминокислоты во всех SEQ ID NO 3-8 представляют собой "PY". Как дополнительно видно из фиг. 1, положения, соответствующие RT-петле SH3-домена киназы Fyn из SEQ ID NO: 11 (т.е. подчеркнутая последовательность и смежный D), изменены по сравнению с последовательностью SH3 Fyn дикого типа, однако сохранены у SEQ ID NO: 3-8 и имеют последовательность "EVYGPMP" (SEQ ID NO: 2). Аминокислотные положения в RT- и src-петле, в том числе аминокислоты, находящиеся смежно с этими петлями, определяют специфичность связывания с FGFR3b и 3c.

В соответствии с SEQ ID NO: 1 любая аминокислота может находиться не только в аминокислотных положениях от (X^1) до (X^4), но также в аминокислотных положениях (X^5) и (X^6). Как можно понять из фиг. 1, аминокислоты в положениях (X^5) и (X^6) могут отличаться среди SEQ ID NO: 3-8 или от SH3-домена Fyn дикого типа SEQ ID NO: 11. Считается, что различия аминокислот в этих положениях не являются важными для специфичности связывания SEQ ID NO: 3-8. Таким образом, аминокислотные положения (X^5) и (X^6) могут быть заменены или удалены, или могут быть добавлены дополнительные аминокислоты, практически не влияя на специфичность связывания с FGFR3b и 3c. При замене аминокислот в сравнении с аминокислотами, которые можно найти в SEQ ID NO: 1-8 в аминокислотных положениях от (X^5) до (X^6), предпочтительными являются консервативные замены. SEQ ID NO: 19 представляет собой последовательность, полученную из полипептида, связывающего FGFR3b и FGFR3c, под SEQ ID NO: 22. Аминокислотные положения 12-18 из SEQ ID NO: 22 (EVMSTTA (SEQ ID NO: 20)) соответствуют RT-петле SH3-домена киназы Fyn из SEQ ID NO: 11, и аминокислотные положения 31-35 из SEQ ID NO: 22 (SQSPH (SEQ ID NO: 21)) соответствуют src-петле SH3-домена киназы Fyn из SEQ ID NO: 11. Второе и третье положение в направлении C-конца относительно src-петли представляют собой "DW" в последовательности дикого типа, тогда как соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 22 представляют собой "QY". Также в SEQ ID NO: 22 аминокислотные положения в RT-и src-петле, в том числе аминокислоты, находящиеся смежно с этими петлями, определяют специфичность связывания с FGFR3b и 3c.

В соответствии с SEQ ID NO: 19 в аминокислотном положении (X^6) может находиться любая аминокислота. Аминокислотное положение (X^6) из SEQ ID NO: 19 соответствует аминокислотному положению (X^6) из SEQ ID NO: 1. В SEQ ID NO 1 и 19 аминокислота (X^6) отличается от SH3-домена Fyn дикого типа из SEQ ID NO: 11. Соответствующей аминокислотой является Y в SEQ ID NO: 11, W в SEQ ID NO: 19 и L в SEQ ID NO: 3-8.

В соответствии с настоящим изобретением, термин "процент (%)" идентичности последовательностей" описывает число совпадений ("хитов") идентичных нуклеотидов/аминокислот в двух или более выровненных последовательностях нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностях относительно числа нуклеотидов или аминокислотных остатков, составляющих общую длину последовательностей матричной нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей. Другими словами, применяя выравнивание в отношении двух или более последовательностей или подпоследовательностей можно определять процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 95, 97 или 98% идентичности), в случае если (под)последовательности сравнивают и выравнивают для максимального соответствия на протяжении интервала сравнения или на протяжении обозначенной области, измеряемого с применением алгоритма сравнения последовательностей, известного из уровня техники, или в случае если их выравнивают вручную и проверяют визуально. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут отличаться

замещением(ями), добавлением(ями) или делецией(-ями) нуклеотидов или аминокислот. Это определение также применимо к комплементарной цепи исследуемой последовательности.

Специалисту в данной области техники также известны подходящие программы для выравнивания полипептидных последовательностей. Процент идентичности последовательностей у полипептидных последовательностей можно, например, определить с помощью таких программ, как описанные выше программы CLUSTLAW, FASTA и BLAST. Предпочтительно применяют программу BLAST, а именно алгоритм BLAST NCBI (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schöffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402).

Что касается идентичности последовательностей, то, как указано в разделе (b) в данном документе выше, предпочтительно, чтобы идентичность последовательностей составляла по меньшей мере 98%. В данном отношении следует дополнительно отметить, что идентичность последовательностей, составляющая по меньшей мере 95%, как указано в разделе (b), допускает две аминокислотные замены, тогда как предпочтительная идентичность по меньшей мере 98% допускает лишь одну аминокислотную замену. Следовательно, раздел (b), который указан в данном документе выше, также относится к аминокислотной последовательности, которая отличается двумя аминокислотными заменами и предпочтительно одной аминокислотной заменой от аминокислотной последовательности из раздела (a), который указан в данном документе выше, где аминокислотная(ые) замена(ы) может(могут) встречаться в аминокислотных положениях SEQ ID NO: 1, отличных от таковых от (X^1) до (X^6) аминокислотной последовательности EVYGPMP (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1, и в аминокислотах P и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1. Полагают, что аминокислоты в SEQ ID NO: 1, отличной от таковых от (X^1) до (X^6) аминокислотной последовательности EVYGPMP (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1 и в аминокислотах P и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1, не важны для специфичности связывания SEQ ID NO: 3-8. Таким образом, в этих положениях аминокислоты могут быть заменены или удалены, или может быть добавлена аминокислота, практически не влияя на специфичность связывания с FGFR3b и 3c. Эти аминокислотные положения предпочтительно заменены. При замене аминокислот предпочтительны консервативные замены.

Что касается идентичности последовательностей, то как указано в разделе (d) в данном документе выше, предпочтительно, чтобы идентичность последовательностей составляла по меньшей мере 97%. В данном отношении следует дополнительно отметить, что идентичность последовательностей, составляющая по меньшей мере 95%, как указано в разделе (d), допускает две аминокислотные замены, тогда как предпочтительная идентичность, составляющая по меньшей мере 97%, допускает лишь одну аминокислотную замену. Следовательно, раздел (d), который указан в данном документе выше, также относится к аминокислотной последовательности, которая отличается двумя аминокислотными заменами и предпочтительно одной аминокислотной заменой от аминокислотной последовательности из раздела (c), который указан в данном документе выше, где аминокислотная(ые) замена(ы) может(могут) встречаться в аминокислотных положениях SEQ ID NO: 19, отличных от аминокислотных последовательностей EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 и в аминокислотах Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 19. Полагают, что аминокислоты в SEQ ID NO: 19, отличной от аминокислотных последовательностей EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 и в аминокислотах Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 19, не важны для специфичности связывания SEQ ID NO: 22. Таким образом, в этих положениях аминокислоты могут быть заменены или удалены, или может быть добавлена аминокислота, практически не влияя на специфичность связывания с FGFR3b и 3c. Эти аминокислотные положения предпочтительно заменены. При замене аминокислот предпочтительны консервативные замены.

Фраза "при определении идентичности исключаются аминокислотные положения от (X^1) до (X^6)", используемая в данном документе в сочетании с SEQ ID NO: 1, уточняет, что вычисление идентичности последовательностей в отношении SEQ ID NO: 1 не принимает во внимание аминокислотные положения от (X^1) до (X^6). Аналогично, фраза "при определении идентичности исключается аминокислотное положение (X^6)", используемая в данном документе в сочетании с SEQ ID NO: 19, уточняет, что вычисление идентичности последовательностей в отношении SEQ ID NO: 19 не принимает во внимание аминокислотное положение (X^6).

Условие "при условии, что аминокислотная последовательность EVYGPMP (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1 является консервативной", используемое в данном документе, уточняет, что какие-либо замены аминокислот не могут вводиться в аминокислотные положения 12-19 из SEQ ID NO: 1. Аналогично, условие "при условии, что аминокислоты P и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1 являются консервативными", используемое в данном документе, уточняет, что какая-либо замена аминокислоты не может вводиться в аминокислотные положения 37 и 38 из SEQ ID NO: 1. Другими словами, аминокислотные положения, соответствующие аминокис-

лотным положениям 12-19 SEQ ID NO: 1, имеют последовательность EVYGPTRM (SEQ ID NO: 2), и аминокислоты в положениях 37 и 38 представляют собой соответственно Р и Y во всех полипептидах, подпадающих под действие разделов (а) и (b) первого варианта осуществления настоящего изобретения и его предпочтительных примеров.

Условие "при условии, что аминокислотные последовательности EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными", используемое в данном документе, уточняет, что какие-либо замены аминокислот не могут вводиться в аминокислотные положения 12-18, а также 31-35 из SEQ ID NO: 19. Аналогично, условие "при условии, что аминокислоты Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 в SEQ ID NO: 19 являются консервативными", используемое в данном документе, уточняет, что какая-либо замена аминокислоты не может вводиться в аминокислотные положения 37 и 38 из SEQ ID NO: 19. Другими словами, аминокислотные положения, соответствующие аминокислотным положениям 12-18 из SEQ ID NO: 19, имеют последовательность EVMSTTA (SEQ ID NO: 20), аминокислотные положения, соответствующие аминокислотным положениям 31-35 из SEQ ID NO: 19, имеют последовательность SQSPH (SEQ ID NO: 21), и аминокислоты в положениях 37 и 38 представляют собой соответственно Q и Y во всех полипептидах, подпадающих под действие разделов (с) и (d) первого варианта осуществления настоящего изобретения и его предпочтительных примеров.

Как уже упоминалось, любое аминокислотное замещение в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 19 предпочтительно является консервативным аминокислотным замещением. Консервативное замещение указывает на замену аминокислоты другой аминокислотой, имеющей химическое свойство, сходное с заменяемой аминокислотой. Предпочтительно, консервативное замещение, упоминаемое в данном документе, представляет собой замещение, выбранное из группы, состоящей из: (i) замещения основной аминокислоты другой основной аминокислотой; (ii) замещения кислой аминокислоты другой кислой аминокислотой; (iii) замещения ароматической аминокислоты другой ароматической аминокислотой; (iv) замещения неполярной алифатической аминокислоты другой неполярной алифатической аминокислотой и (v) замещения полярной незаряженной аминокислоты другой полярной незаряженной аминокислотой. Основными аминокислотами являются аргинин, гистидин и лизин. Кислыми аминокислотами являются аспаргат и глутамат. Ароматическими аминокислотами являются фенилаланин, тирозин и триптофан. Неполярными алифатическими аминокислотами являются глицин, аланин, валин, лейцин, метионин, изолейцин и пролин. Полярными незаряженными аминокислотами являются серин, треонин, цистеин, аспарагин и глутамин. В отличие от консервативного аминокислотного замещения, неконсервативное аминокислотное замещение представляет собой замену одной аминокислоты любой аминокислотой, которая не подпадает под указанные выше консервативные замещения (i)-(v).

Раскрытые в данном документе финомеры, связывающие FGFR3, преимущественно характеризуются превосходной аффинностью связывания с FGFR3c и 3b и, кроме того, особенно подходят для интернализации в клетки, где они могут оказывать диагностический или терапевтический эффект. Как можно понять из примеров, приведенных в данном документе ниже, при скрининге большой библиотеки финомеров был обнаружен финомер, связывающий FGFR3, из SEQ ID NO: 3. Было доказано, что финомеры, связывающие FGFR3, из SEQ ID NO: 3 и 19 обладают выдающимися свойствами в том, что касается их аффинности связывания с изоформами 3b и 3c FGFR3, а также их свойств интернализации клеток; см. примеры 1 и 7. Следовательно, финомер под SEQ ID NO: 19 является альтернативой финомерам под SEQ ID NO: 1. Неожиданно и преимущественно, оба финомера обладают схожей комбинацией преимущественных свойств. Финомер, связывающий FGFR3, из SEQ ID NO: 3 использовали в качестве матрицы для созревания аффинности, и даже была возможность дополнительно улучшить аффинность связывания с FGFR3b и 3c. Более подробно, среди большого пула полипептидов, полученных в результате процесса созревания аффинности, было обнаружено, что финомер, связывающий FGFR3, из SEQ ID NO: 4-8 еще сильнее связывается с FGFR3b и 3c, чем финомер, связывающий FGFR3, из SEQ ID NO: 3. Более того, в примерах, приведенных в данном документе ниже, показано, что финомеры, связывающие FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8 и 22 можно получить рекомбинантно, и они имеют благоприятные технологические свойства, а следовательно могут быть получены в большом масштабе, например для терапевтических и диагностических путей применения. Дополнительно, финомер, связывающий FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8 и 22 связывается не только с FGFR3c и 3b человека, но и с FGFR3c (и возможно также с 3b) мыши и обезьяны. Такое межвидовое связывание обладает рядом преимуществ для доклинических испытаний. Эти молекулы можно применять для диагностических целей, а также они пригодны в качестве исходной точки для разработки дополнительных терапевтических средств против опухолевых клеток, которые экспрессируют FGFR3 на своей поверхности, например, которые описаны более подробно в данном документе. Ни один из остальных финомеров, связывающих FGFR3, выявленных в результате первоначальных скринингов или в последующем процессе созревания аффинности, не обладал такой же преимущественной комбинацией свойств, как финомеры, связывающие FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8 и 22. Удивительная и непредсказуемая преимущественная комбинация свойств финомеров, связывающих FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8 и 22 будет дополнительно видна из примеров, приведенных в данном документе ниже.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления первого аспекта настоящего изобре-

тения (X^1) представляет собой N, R или K и предпочтительно представляет собой R или K; (X^2) представляет собой S, G, K или R и предпочтительно представляет собой G, K или R; (X^3) представляет собой S или G и предпочтительно представляет собой G; и (X^4) представляет собой E, Q, D, S или K и предпочтительно представляет собой Q, D, S или K.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления первого аспекта настоящего изобретения (X^1) представляет собой N, R или K и предпочтительно представляет собой R или K; (X^2) представляет собой S, G, K или R и предпочтительно представляет собой G, K или R; (X^3) представляет собой S или G и предпочтительно представляет собой G; (X^4) представляет собой E, Q, D, S или K и предпочтительно представляет собой Q, D, S или K; (X^5) представляет собой T или A; и (X^6) представляет собой Y, W или L и предпочтительно представляет собой L или W.

Аминокислотные положения от (X^1) до (X^4) в SEQ ID NO: 1 представляют собой аминокислотные положения, соответствующие аминокислотам, образующим src-петлю SH3-домена человеческой Фун дикого типа. В примерах, приведенных в данном документе ниже, показано, что аминокислоты, перечисленные для аминокислотных положений от (X^1) до (X^4), придают специфичность связывания с FGFR3b и FGFR3c, в частности с FGFR3b, имеющим SEQ ID NO: 9, и с FGFR3c, имеющим SEQ ID NO: 10. Более подробно, из результатов выравнивания последовательностей SEQ ID NO: 3-8 по настоящему изобретению, показанных на фиг. 1, видно, что в финомерах, связывающих FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8 могут встречаться аминокислоты, которые перечислены для аминокислотных положений от (X^1) до (X^4) в вышеуказанном предпочтительном варианте осуществления. Предпочтительные аминокислоты, которые перечислены для аминокислотных положений от (X^1) до (X^4) в вышеуказанном предпочтительном варианте осуществления, могут встречаться в соответствующих аминокислотных положениях SEQ ID NO: 4-8, при этом следует отметить, что SEQ ID NO: 4-8 были получены из SEQ ID NO: 3 путем созревания аффинности. Можно ожидать, что специфичность связывания с FGFR3b и 3c также придают и другие аминокислотные последовательности, выбранные из таковых от (X^1) до (X^4), как определено выше, помимо конкретных аминокислотных комбинаций для таковых от (X^1) до (X^4), которые представлены в SEQ ID NO: 3-8, предпочтительно в SEQ ID NO: 4-8.

Как рассмотрено выше, аминокислотное положение (X^5) в SEQ ID NO: 1 и аминокислотное положение (X^6) в SEQ ID NO: 1 и 19 представляют собой аминокислотные положения, которые не соответствуют ни аминокислотам из RT и src-петли SH3-домена человеческой Фун дикого типа, ни аминокислотам, которые являются смежными с одной из этих петель. В связи с этим полагают, что в этих положениях аминокислоты могут быть заменены или удалены, или может быть добавлена дополнительная аминокислота, практически не влияя на специфичность связывания с FGFR3b и 3c. Аминокислоты в положениях (X^5) и (X^6) предпочтительно заменены. Более предпочтительно, чтобы (X^5) представляло собой T или A; и (X^6) представляло собой Y, W или L и наиболее предпочтительно представляло собой L или W. Как можно понять из фиг. 1, эти аминокислоты для (X^5) из SEQ ID NO: 1 и (X^6) из SEQ ID NO: 1 и 19 можно найти либо в SEQ ID NO: 3-8 и 22 или в SH3-доме человека человеческой Фун дикого типа (SEQ ID NO: 11), либо в другом финомере, связывающемся с FGFR3b и 3c. В случае наиболее предпочтительной аминокислоты для положения (X^6) эту аминокислоту можно найти в SEQ ID NO: 3-8.

В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления первого аспекта настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 3-8 и 22, предпочтительно из любой из SEQ ID NO: 4-8 или 22.

Как можно понять из примеров, приведенных в данном документе ниже, SEQ ID NO: 3-8 и 22 представляют собой последовательности конкретных финомеров, связывающих FGFR3b и 3c, которые были созданы и испытаны.

В соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления первого аспекта настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 22. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, является особенно предпочтительным. Другим особенно предпочтительным вариантом осуществления является полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

Было довольно неожиданно получить финомер с низкой наномолярной аффинностью уже при первом скрининге. Финомер, имеющий SEQ ID NO: 3, был выделен из библиотеки финомеров в виде финомера, обладающего наиболее выдающимися свойствами аффинности связывания FGFR3b и 3c и интернализации. Финомеры с SEQ ID NO: 4-8 были получены из SEQ ID NO: 3, и аффинность связывания с FGFR3b и 3c у финомеров, имеющих SEQ ID NO: 4-8, еще более улучшена.

К удивлению, финомер с SEQ ID NO: 22 также имел очень хорошие свойства, сравнимые с таковыми у SEQ ID NO: 4-8, хотя первоначально он был получен из другого семейства финомеров.

Настоящее изобретение во втором аспекте относится к слитой конструкции, содержащей полипептид по настоящему изобретению, слитый с дополнительным соединением.

Используемый в данном документе термин "слитая конструкция" определяет слияние полипептида по настоящему изобретению с дополнительным соединением. Соединение может представлять собой либо белковое соединение, либо небелковое соединение. В случае если соединение представляет собой

белковое соединение (например, цитокин, или хемокин, или антитело, или фрагмент антитела, как описано в данном документе ниже), слитая конструкция также может быть обозначена как слитый белок. Используемый в данном документе термин "слитый белок" в общих чертах относится к полипептидной конструкции, созданной посредством связывания и экспрессии двух или более генов, которые кодируют отдельные полипептиды или полипептид и пептид. Другими словами, трансляция этого слитого гена приводит к получению одного полипептида с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных полипептидов. Полипептиды могут быть слиты либо непосредственно, либо через линкер, т.е. короткую пептидную последовательность. Как правило, слитые белки создают искусственно с помощью технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники (например, Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science, p. 518-519). Тем не менее, полипептиды и слитые белки по настоящему изобретению можно получить с помощью любой из многих традиционных и хорошо известных методик, таких как стратегии простого органического синтеза, методики твердофазного синтеза или с помощью коммерчески доступных автоматических синтезаторов. Слитые белки можно применять в биологическом исследовании, методах диагностики или терапии.

Примерами небелковых соединений в качестве дополнительного соединения являются, например, небольшие органические молекулы, такие как полиэтиленгликоль (PEG), или Alexa Fluor, или радионуклиды. Дополнительные конкретные примеры небелковых дополнительных соединений рассмотрены в данном документе ниже.

В соответствии с определенными вариантами осуществления второго аспекта настоящего изобретения дополнительное соединение представляет собой фармацевтически активное соединение, пролекарство, фармацевтически приемлемый носитель, диагностически активное соединение, усилитель проникновения в клетку и/или соединение, модулирующее период полужизни в сыворотке.

Фармацевтически активное соединение представляет собой соединение, обладающее биологической активностью при введении субъекту, которая оказывает благоприятный эффект в отношении субъекта. Пролекарство представляет собой соединение, которое вводят субъекту в неактивной (или менее чем полностью активной) форме и которое впоследствии превращается в фармацевтически активное или полностью фармацевтически активное соединение в результате метаболических процессов у субъекта. Фармацевтически (полностью) активное соединение предпочтительно представляет собой соединение, подходящее для лечения или предупреждения любого из конкретных заболеваний, определенных в данном документе ниже.

Диагностически активное соединение представляет собой соединение, обладающее активностью при введении субъекту, которая дает возможность (помогает) определять или идентифицировать заболевание или нарушение, если индивидуум страдает таким заболеванием или нарушением. Примеры диагностически активных соединений включают выявляемые маркеры, такие как флуоресцентные красители, радионуклиды или контрастные средства для медицинской визуализации. Конкретные примеры флуоресцентных красителей, радионуклидов и контрастных средств для медицинской визуализации описаны в данном документе ниже. Диагностически активное соединение, слитое с полипептидом по настоящему изобретению, можно, в частности, применять для облегчения определения или идентификации или для определения или идентификации любого из конкретных заболеваний, определенных в данном документе ниже, которые имеют общий признак в том, что их происхождение и/или симптом(ы) связаны с FGFR3, в частности связаны с FGFR3b и 3c. Пораженные таким заболеванием участки в организме субъекта можно выявлять или идентифицировать с помощью полипептида по настоящему изобретению, слитого с диагностически активным соединением по настоящему изобретению.

Усилитель проникновения в клетку представляет собой соединение, облегчающее доставку полипептида по настоящему изобретению в (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) клетку.

Соединение, модулирующее период полужизни в сыворотке, представляет собой соединение, которое дает возможность увеличить период полужизни *in vivo* полипептидов по настоящему изобретению, в частности в системе кровообращения. Компонентом, модулирующим период полужизни в сыворотке, предпочтительно является полиэтиленгликоль (PEG).

Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой соединение, которое облегчает или улучшает, например, доставку и/или эффективность полипептида по настоящему изобретению при введении субъекту. Подходящие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны из уровня техники и включают, например, стабилизаторы, антиоксиданты, pH-регулирующие вещества и т.д.

В соответствии с одним вариантом осуществления второго аспекта настоящего изобретения дополнительное соединение представляет собой токсичное соединение.

Токсичное соединение предпочтительно представляет собой небольшое органическое соединение или полипептид, например токсичное соединение, выбранное из группы, состоящей из калихеамицина, майтансиноида, неокарзиностатина, эсперамицина, динемидина, кедарцидина, мадуропептина, доксорубицина, даунорубицина, ауристатина, ацистатина, цепи рицина А, модессина, укороченного эндотоксина А Pseudomonas, дифтеротоксина и рекомбинантного гелонина.

В соответствии с другим вариантом осуществления второго аспекта настоящего изобретения, дополнительное соединение по настоящему изобретению выбрано из группы, состоящей из (а) флуорес-

центного красителя, (b) фотосенсибилизатора, (c) радионуклида, (d) контрастного средства для медицинской визуализации, (e) цитокина, (f) хемокина, (g) прокоагулянтного фактора, (h) фермента для активации пролекарства, (i) связывающейся с альбумином молекулы, (j) альбумина, (k) связывающейся с IgG молекулы или (l) полиэтиленгликоля.

Примерами флуоресцентного красителя являются красители Alexa Fluor и Cy.

Примерами фотосенсибилизатора являются фототоксичный красный флуоресцентный белок KillerRed и гематопорфирин.

Примерами радионуклидов являются гамма-излучающие изотопы, например ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , излучатели позитронов, например ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , бета-излучатели, например ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , и альфа-излучатели, например ^{213}Bi , ^{211}At .

Контрастное средство, используемое в данном документе, представляет собой вещество, применяемое для контрастирования структур или жидкостей в организме при медицинской визуализации. Обычные контрастные средства работают на основе ослабления рентгеновского излучения и усиления сигнала магнитного резонанса.

Цитокин, например, может быть выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-12, TNF-альфа, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF-бета, LT-бета, лиганда CD-40, лиганда Fas, TGF-бета, IL-1-альфа и IL-1-бета. Как хорошо известно из уровня техники, цитокины могут способствовать провоспалительному или противовоспалительному ответу иммунной системы. Таким образом, в зависимости от подлежащего лечению заболевания преимущественными могут быть конструкции, слитые с провоспалительным или противовоспалительным цитокином. Например, для лечения воспалительных заболеваний, в целом, предпочтительными являются слитые конструкции, содержащие противовоспалительные цитокины, тогда как для лечения рака, в целом, предпочтительными являются слитые конструкции, содержащие провоспалительные цитокины.

Хемокин можно выбрать, например, из группы, состоящей из IL-8, GRO-альфа, GRO-бета, GRO-гамма, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1-альфа/бета, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1-альфа, MIP-1-бета, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3-альфа, MIP-3-бета, MCP-1-5, зотаксина, зотаксина-2, I-309, MIPF-1, 6C-кина, STACK, MEC, лимфотактина и фракталкина.

Примерами прокоагулянтного фактора являются тканевый фактор (TF) и раковый прокоагулянт (CP).

Примерами фермента для активации пролекарства являются такие ферменты, как карбоксипептидазы, глюкуронидазы или глюкозидазы.

Примеры связывающейся с альбумином молекулы и связывающейся с IgG молекулы описаны в Gebauer and Skerra (2009), *Curr Opin Chem Biol.*, 13(3):245-255. Соответственно, примерами связывающихся с альбумином молекул и связывающихся с IgG молекул являются отдельные домены Ig человека (сдвоенные Dab альбумина), нанотела, встречающийся в природе альбуминсвязывающий домен (ABD), полученный из стрептококкового белка G, и домен, который связывается с IgG. Такие слитые конструкции, например, увеличивают период полужизни полипептида по настоящему изобретению при введении пациенту, в частности в системе кровообращения.

В соответствии с другими вариантами осуществления второго аспекта настоящего изобретения дополнительное соединение по настоящему изобретению содержит легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела, Fc-домен антитела, антитело или их комбинацию.

Термин "антитело" включает моноклональные антитела, одноцепочечные антитела или их фрагменты, также в том числе биспецифические антитела, синтетические антитела, фрагменты антител, сохраняющие способность связывания, отличные от тяжелых и легких цепей, такие как Fab, F(ab₂)', фрагменты Fv или scFv и т.д. или химически модифицированное производное любого из них. Антитела или их фрагменты, например, можно получить с помощью способов, которые описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. В случае если получают производные указанных антител с помощью методики фагового дисплея, то для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с эпитопом пептида или полипептида по настоящему изобретению, можно применять поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIACore (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). Получение химерных антител описано, например, в WO 89/09622. Дополнительным источником антител, подлежащих использованию в соответствии с настоящим изобретением, являются так называемые ксеногенные антитела. Общая идея получения ксеногенных антител, таких как человеческие антитела у мышей, описан, например, в WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, или их соответствующую(ие) иммуноглобулиновую(ые) цепь(и) можно дополнительно модифицировать с помощью традиционных методик, известных из уровня техники, например, с помощью делеции(й), вставки(ок), замещения(ий), добавления(ий) аминокислот, и/или рекомбинации(й), и/или любой(ых) другой(их) модификации(й), известных из уровня техники, либо отдельно, либо в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо

известны специалисту в данной области техники; см., например, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Термин антитело также относится к производным указанных антител, которые сохраняют или фактически сохраняют свою специфичность связывания. Тогда как особенно предпочтительные варианты осуществления указанных производных дополнительно указаны в данном документе ниже, другими предпочтительными производными таких антител являются химерные антитела, содержащие, например, переменную область мыши или крысы и константную область человека.

Антитело может представлять собой гуманизованное антитело. Термин "гуманизованное антитело" означает, в соответствии с настоящим изобретением, антитело нечеловеческого происхождения, белковые последовательности которого были модифицированы для увеличения его сходства с вариантами антител, которые в норме вырабатываются у людей. Создание гуманизованного антитела можно осуществить, например, путем вставки соответствующих сегментов, кодирующих CDR (отвечающих за требуемые свойства связывания), таких как CDR 3 и предпочтительно все 6 CDR, в "каркас" человеческого антитела. Способы получения гуманизованных антител описаны, например, в EP-A1 0239400 и WO 90/07861.

Термин "легкая цепь антитела" означает малую полипептидную субъединицу антитела, тогда как термин "тяжелая цепь антитела" означает большую полипептидную субъединицу антитела. Типичное антитело состоит из двух тяжелых цепей иммуноглобулина (Ig) и двух легких цепей Ig. Каждая легкая цепь состоит из двух tandemных доменов иммуноглобулина: одного константного (C_L) домена и одного переменного домена (V_L), который важен для связывания антигена. Тяжелая цепь определяет класс или изотип антитела. Каждая тяжелая цепь имеет две области, а именно, константную область (которая одинакова для всех иммуноглобулинов одного и того же класса, но различается в разных классах) и переменную область, которая отличается между разными В-клетками, но одинакова для всех иммуноглобулинов, вырабатываемых одной и той же В-клеткой или одним и тем же клоном В-клетки. Переменный домен любой тяжелой цепи состоит из одного домена иммуноглобулина.

"Функциональный Fc-домен" антитела является термином, хорошо известным специалисту в данной области техники, и определяется по расщеплению антител папаином. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, иммуноглобулины делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. В соответствии с константными областями тяжелой цепи различные классы иммуноглобулинов соответственно называются [альфа], [дельта], [эпсилон], [гамма] и [мю]. Функциональный Fc-домен антитела непосредственно вовлечен в ADCC (антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность), в основе которых лежит активация комплемента, связывание C1q и связывание Fc-рецептора. Четыре изотипа IgG человека связывают различные рецепторы, такие как неонатальный Fc-рецептор, активирующие Fc-гамма рецепторы, FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIIa, ингибиторный рецептор FcγRIIb и C1q с различными значениями аффинности, что приводит к очень разным активностям. Известно, что значения аффинности к активирующим и ингибирующим рецепторам Fc-домена человеческого антитела можно задать путем конструирования и модифицировать (см. Strohl W. (2009) *Curr Opin Biotechnol*, 20, p. 685-691).

Предпочтительно, Fc-домен представляет собой один или несколько функциональных Fc-доменов человека, которые дают возможность продлевать период полужизни *in vivo* полипептидов по настоящему изобретению, и некоторые из которых направляют иммунный ответ млекопитающего к участку специфического связывания мишени полипептидным компонентом по настоящему изобретению в слитом белке, например, в терапевтических, профилактических и/или диагностических путях применения, как описано в данном документе ниже. Более предпочтительно, такой человеческий функциональный Fc-домен получен из антитела IgG1. Полипептиды по настоящему изобретению могут быть слиты либо с N-или C-концом одного или нескольких функциональных Fc-доменов, либо как с N-, так и с C-концом одного или нескольких Fc-доменов. В определенных вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению также могут содержать мультимеры, например тетрамеры, тримеры или димеры полипептидов по настоящему изобретению, слитых на по меньшей мере одной стороне, например с N-концом Fc-домена.

Fc-домен может представлять собой один или несколько сконструированных функциональных Fc-доменов человека IgG1 с активирующими или молчащими эффекторными функциями, например один или несколько сконструированных функциональных Fc-доменов человека IgG1 с молчащими эффекторными функциями, например один или несколько сконструированных функциональных Fc-доменов человека IgG1 с молчащими эффекторными функциями с мутацией в L234 и L235, нумерация в соответствии с EU-системой согласно Kabat (см. Johnson G. and Wu T.T. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, p. 214-218), например с мутацией L234A и L235A.

Полипептид по настоящему изобретению может быть расположен ниже C-конца указанного дополнительного соединения, содержащего легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела, Fc-домен антитела, антитело или их комбинацию. Как альтернатива, полипептид по настоящему изобретению может быть расположен ниже N-конца указанного дополнительного соединения, содержащего легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела, Fc-домен антитела, антитело или их комбинацию.

В случае если слитая конструкция по настоящему изобретению содержит полипептид по настоящему изобретению, слитый с антителом, - слитая конструкция по настоящему изобретению предпочтительно содержит две копии полипептида по настоящему изобретению. Две копии могут являться двумя копиями одного и того же полипептида по настоящему изобретению или разных полипептидов по настоящему изобретению и предпочтительно являются двумя копиями одного и того же полипептида по настоящему изобретению. Более предпочтительно, две копии полипептида по настоящему изобретению могут быть слиты с N-концом двух легких цепей антитела, C-концом двух легких цепей антитела, N-концом двух тяжелых цепей антитела или C-концом двух тяжелых цепей антитела. Примеры финомеров, которые слиты с моноклональными антителами, что дает так называемые финомабы, которые обладают двойной специфичностью, и их получение подробно было описано, к примеру, в (например, Silacci et al, 2016, mAbs 8: 1, 141-149; Brack et al, 2014, Mol Cancer Ther 13(8): p. 2030-9; WO 2014/044758 A1; WO 2014/170063 A1; WO 2015/141862 A1).

Слитую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит полипептид по настоящему изобретению, слитый с антителом, можно получить *ex vivo* или *in vitro* путем сведения вместе в подходящих условиях тяжелых и легких цепей антитела, при этом следует отметить, что полипептид по настоящему изобретению слит по меньшей мере с одной из этих цепей. Специалист в данной области осведомлен о подходящих условиях. Такое сведение вместе в подходящих условиях обеспечивает нековалентную сборку, запускаемую взаимодействиями между легкими цепями антитела и тяжелыми цепями антитела. Предпочтительно, в такой конструкции по настоящему изобретению присутствуют дисульфидные связи, поскольку они повсеместно встречаются в антителах. Дисульфидные связи обычно присутствуют в непосредственной близости от шарнирной области и соединяют две тяжелые цепи и/или легкую цепь и тяжелую цепь. Например, такие конструкции можно получить путем стандартной рекомбинантной экспрессии в клетках млекопитающих, а затем из этих клеток, как правило, секретируются интактные слитые белки по настоящему изобретению, содержащие интактные спаренные антитела.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами осуществления второго аспекта настоящего изобретения антитело направлено к мишени, выбранной из группы, состоящей из GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 и CEACAM-1.

Так, дополнительное соединение по настоящему изобретению также может содержать легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела или антитело, направленное против мишени, выбранной из группы, состоящей из GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 или CEACAM-1.

Как рассмотрено в данном документе выше, сверхэкспрессия FGFR3 была задокументирована при нескольких типах рака. Также при нескольких типах рака была задокументирована сверхэкспрессия GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 и CEACAM-1. По этой причине ожидают, что биспецифические слитые конструкции, способные связывать FGFR3b/3c в качестве первой мишени, а также в качестве второй мишени, которая представляет собой соединение, выбранное из GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 и CEACAM-1, будут особенно пригодными для лечения рака и связанных с ним заболеваний.

Описанное в данном документе выше дополнительное соединение может быть либо непосредственно слито с полипептидом по настоящему изобретению, либо слито через линкер. Соответственно, полипептид может быть (непосредственно) слит, например, с C-концом дополнительного соединения, более конкретно путем образования пептидной связи между карбоксигруппой C-концевой аминокислоты и аминогруппой N-концевой аминокислоты, или может быть соединен с C-концом цепи дополнительного соединения через линкер.

Подходящие линкеры доступны для специалиста в данной области техники. Линкер в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран, например, из группы, состоящей из алкила с 1-30 атомами углерода, полиэтиленгликоля с 1-20 этиленовыми группами, полиаланина с 1-20 остатками, капроновой кислоты, замещенного или незамещенного поли-*p*-фенилена и триазола. Предпочтение отдают пептидным линкерам, более конкретно олигопептидам, имеющим длину от 1 до 30 аминокислот. Предпочтительные диапазоны длин составляют от 5 до 15 аминокислот.

Особенно предпочтительными являются линкеры, которые представляют собой пептиды, которые состоят на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90 или 100% из небольших аминокислот, таких как глицин, серин и аланин. Особенно предпочтительными являются линкеры, состоящие только из глицинов и серинов. Неограничивающим примером подходящего линкера является линкер (G₄S)₃ (3 повтора Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по настоящему изобретению, или слитую конструкцию по настоящему изобретению, или одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих слитую конструкцию по настоящему изобретению.

Одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих конструкцию по настоящему изобретению

бретению, могут представлять собой, например, две молекулы нуклеиновой кислоты, где одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует легкую цепь антитела, и другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь антитела. Как рассмотрено выше, полипептид по настоящему изобретению в этом случае можно слить либо с легкой, либо с тяжелой цепью на С-конце или N-конце.

Молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включают ДНК, такую как cDNA, и mRNA, а также PNA. Дополнительно включены имитирующие нуклеиновую кислоту молекулы, известные в данной области техники, такие как синтетические или полусинтетические производные ДНК или РНК и смешанные полимеры, как смысловые, так и антисмысловые цепи. Они могут содержать дополнительные неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, что будет совершенно понятно специалистам в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотид или молекула(ы) нуклеиновой кислоты представляет/представляют собой ДНК. Такие имитирующие нуклеиновую кислоту молекулы или производные нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включают фосфоротиоатную нуклеиновую кислоту, фосфорамидатную нуклеиновую кислоту, 2'-О-метоксиэтилрибонуклеиновую кислоту, морфолинонуклеиновую кислоту, гекситолнуклеиновую кислоту (HNA) и запертую нуклеиновую кислоту (LNA) (см., например, Braasch and Corey, *Chemistry & Biology* 8, 1-7 (2001)). LNA представляет собой производное РНК, в котором рибозное кольцо ограничено метиленовой связью между 2'-кислородом и 4'-углеродом.

В тех вариантах осуществления, где молекула нуклеиновой кислоты содержит (а не состоит из нее) указанную последовательность, по конкретной последовательности простираются дополнительные нуклеотиды либо на 5'-конце или 3'-конце, либо на обоих концах.

Дополнительные гетерологичные последовательности могут включать гетерологичные промоторы, которые функционально связаны с кодирующими последовательностями вышеупомянутых молекул. Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с промотором. Промоторы хорошо известны специалисту в данной области техники и повседневно используются в данной области техники. Неограничивающим примером является немедленно-ранний промотор CMV, который обычно управляет сильной экспрессией в клетках млекопитающих.

Настоящее изобретение также относится к одному или нескольким векторам, содержащим одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, а также к одной или нескольким клеткам-хозяевам, содержащим одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или один или несколько векторов по настоящему изобретению.

Дополнительно, настоящее изобретение относится к клетке, предпочтительно выделенной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению. Эту клетку также называют клеткой-хозяином.

Векторы и выделенные клетки, в частности клетки-хозяева, могут быть любого традиционного типа, который подходит для этой цели, например, для получения полипептидов, и/или слитых конструкций по настоящему изобретению, и/или терапевтически пригодных векторов и клеток-хозяев. Специалист в данной области техники сможет подобрать такие векторы и клетки-хозяева из уровня техники и подтвердить их особую пригодность для требуемого назначения с помощью стандартных способов и без излишних трудностей.

Один или несколько векторов по настоящему изобретению содержат одну или несколько нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и предпочтительно способны производить полипептид или слитый белок по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления такие векторы выбраны из группы, состоящей из векторов pQE, векторов pET, векторов pFUSE, векторов pUC, векторов YAC, фагмидных векторов, фаговых векторов, векторов, применяемых для генной терапии, таких как ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы. Методики модификации векторов см. в Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Обычно векторы могут содержать одну или несколько точек начала репликации (ori) и систем наследования для клонирования или экспрессии, один или несколько маркеров для отбора у хозяина, например устойчивости к антибиотику, и одну или несколько кассет экспрессии. К подходящим точкам начала репликации (ori) относятся, например, точки начала репликации Col E1 вирусов SV40 и M13.

Одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также можно вставить в один или несколько векторов так, чтобы образовывалось трансляционное слияние с другой молекулой нуклеиновой кислоты. Другая молекула нуклеиновой кислоты может, например, кодировать легкую и/или тяжелую цепь антитела и/или линкер, предпочтительные примеры которых описаны в данном документе выше.

Одну или несколько клеток-хозяев можно получить путем введения одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты или одного или нескольких векторов по настоящему изобретению в одну или несколько клеток-хозяев, которые при их наличии опосредуют экспрессию полипептидов, кодируемых указанными молекулами нуклеиновой кислоты или векторами. Клетки-хозяева предпочтительно представляют собой выделенные клетки-хозяева, что означает то, что клетки не находятся в среде живого организма. Хозяином может являться любая прокариотическая или эукариотическая клетка. Подходящим эукариотическим хозяином может являться клетка млекопитающего, клетка амфибии, клетка рыбы,

клетка насекомого, клетка гриба или клетка растения. Эукариотическая клетка может являться клеткой насекомого, такой как клетка *Spodoptera frugiperda*, клеткой дрожжей, такой как клетка *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, клеткой гриба, такой как клетка *Aspergillus*, или клеткой позвоночного. В последнем случае предпочтительно, чтобы клетка представляла собой клетку млекопитающего, такую как, например, клетка человека, клетка хомяка или клетка обезьяны. Клетка может быть частью клеточной линии.

Подходящими примерами прокариот/бактерий являются обычно используемые для клонирования, такие как *E. coli* (например, штаммы *E. coli* HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 и JM101).

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей полипептид по настоящему изобретению, слитую конструкцию по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или любую их комбинацию.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно могут содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Под "фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем" подразумевают нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство для составления любого типа. Примеры фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей описаны, например, в Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999.

Как более подробно рассмотрено в данном документе выше, FGFR3 вовлечен в патогенез многих заболеваний и, в частности, в патогенез рака. Соответственно, полипептид, слитая конструкция, молекула нуклеиновой кислоты, вектор по настоящему изобретению или любая их комбинация полезны в качестве лекарственного препарата. В указанной фармацевтической композиции полипептид, слитая конструкция, молекулы нуклеиновой кислоты, вектор по настоящему изобретению или любая их комбинация могут являться единственным активным средством, однако как альтернатива они также могут быть объединены с другими активными средствами, как например в комбинированных продуктах. Фармацевтическую композицию можно, к примеру, вводить млекопитающим, таким как домашние и ручные животные, мыши, крысы, кролики, нечеловекоподобные приматы и др. Предпочтительно ее вводят людям. Описанные в данном документе фармацевтические композиции будут вводить субъекту в подходящей дозе.

Фармацевтическую композицию для применения в соответствии с настоящим изобретением можно составить традиционным образом в соответствии со способами, известными из уровня техники, с применением одного или нескольких физиологических носителей или наполнителей, см., например, Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. Соответственно, фармацевтическую композицию можно вводить перорально, парентерально, например, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, интратекально, чрескожно, трансмукозально, субдурально, локально или местно с помощью ионофореза, сублингвально, посредством ингаляционного спрея, аэрозоля или ректально и т.д. в составах, разделенных на единицы дозирования, необязательно содержащих традиционные фармацевтически приемлемые наполнители. Также, диагностические композиции по настоящему изобретению можно изготавливать любым традиционным образом.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде единственного активного ингредиента или в сочетании с другим активным ингредиентом, таким как иммунодепрессивные или иммуномодулирующие средства или другие противовоспалительные средства, например, для лечения или предупреждения упомянутых выше заболеваний. Например, полипептиды, слитые конструкции и конструкции по настоящему изобретению можно применять в комбинации с моноклональными антителами, например, моноклональными антителами с аффинностью к GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 или CEACAM-1.

Диагностическая композиция по настоящему изобретению полезна для выявления нежелательного физиологического уровня FGFR3, в частности из-за нежелательной сверхэкспрессии FGFR3. Указанное выявление обычно предусматривает приведение образца в контакт с полипептидом, слитой конструкцией, конструкцией, молекулой нуклеиновой кислоты, вектором, клеткой-хозяином по настоящему изобретению или любой их комбинацией и выявления наличия в образце FGFR3b и 3c, в частности FGFR3b и 3c с SEQ ID NO: 9 и 10. Соответственно, диагностическую композицию по настоящему изобретению можно применять для оценки начала или статуса заболевания и, в частности, рака или связанного с ним заболевания, ассоциированного со сверхэкспрессией FGFR3.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, описанном в данном документе выше, полипептид по настоящему изобретению связан с флуоресцентным красителем, фотосенсибилизатором, радионуклидом или контрастным средством для медицинской визуализации. Такие слитые конструкции особенно подходят для диагностических путей применения. Это обусловлено тем, что FGFR3, например, сверхэкспрессируется при раке, так что меченный выявляемой меткой полипептид по настоящему изобретению можно применять для визуализации пораженного заболеванием участка организма, диагностируя таким образом наличие рака у субъекта.

Дозировка диагностических и фармацевтических композиций по настоящему изобретению будет варьировать в зависимости от конкретного полипептида, слитой конструкции, конструкции, одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, одного или нескольких векторов по настоящему изобретению или любой их комбинации, группы отдельных пациентов или пациента, необязательного наличия дополнительных активных с точки зрения диагностики или медицины соединений и природы и тяжести подлежащего диагностике или лечению заболевания. Как правило, диагностическую или фармацевтическую композицию применяют в дозировках от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг на килограмм веса тела, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг на килограмм веса тела. Диагностические или фармацевтические композиции можно вводить более чем один раз, например, для отслеживания течения заболевания в случае диагностической композиции или для продления лечения в случае фармацевтической композиции. Например, частота введения диагностической или фармацевтической композиции может находиться в диапазоне от одного раза в сутки до приблизительно одного раза в 3 месяца, например, от приблизительно одного раза в 2 недели до приблизительно одного раза в 10 недель, например один раз в 4-8 недель. В определенных вариантах осуществления режим дозирования предусматривает введение диагностических или фармацевтических композиций по настоящему изобретению от одного раза в месяц до одного раза в 2-3 месяца или реже.

В соответствии с определенными вариантами осуществления фармацевтическая или диагностическая композиция согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предназначена для применения в лечении рака или опосредованного Т-клетками заболевания.

Как рассмотрено в данном документе выше, сообщалось о сверхэкспрессии FGFR3 при нескольких типах рака, так что эти фармацевтические или диагностические композиции особенно подходят для лечения и диагностики рака. Таким образом, рак предпочтительно представляет собой рак, при котором раковая клетка экспрессирует FGFR3 на своей поверхности, или рак, ассоциированный со сверхэкспрессией FGFR3.

Вследствие известной роли экспрессии FGFR3 при раке, фармацевтическую или диагностическую композицию по настоящему изобретению также можно применять в лечении новообразований в целом, в том числе доброкачественных и злокачественных опухолей.

В US 2008/044419 сообщалось, что ингибирование активности FGFR3 является способом лечения опосредованных Т-клетками заболеваний, в частности опосредованных Т-клетками воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

В соответствии с определенными вариантами осуществления четвертого аспекта настоящего изобретения рак выбран из рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, эндометриального рака, глиомы, рака головы и шеи, рака печени, рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака яичка и уротелиального рака.

В соответствии с "Атласом белков человека" (см. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000068078-FGFR3/cancer>), экспрессия FGFR3 была обнаружена при следующих типах рака: раке молочной железы, раке шейки матки, колоректальном раке, эндометриальном раке, глиоме, раке головы и шеи, раке печени, раке легкого, раке яичника, раке поджелудочной железы, раке кожи, раке яичка и уротелиальном раке. Следовательно, можно ожидать, что экспрессия FGFR3 оказывает влияние при развитии этих типов рака.

В соответствии с определенными вариантами осуществления четвертого аспекта настоящего изобретения рак выбран из множественной миеломы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, плоскоклеточного рака легкого и колоректального рака.

Выше в данном документе было рассмотрено, что о сверхэкспрессии FGFR3 сообщалось при множественной миеломе, а также при раке мочевого пузыря. Экспрессия FGFR3 также задействована в раке шейки матки (Capellen et al., Nat Genet. 1999 Sep; 23(1): 18-20.), раке поджелудочной железы (Lafitte et al., Mol Cancer, 2013, 12: 83) и колоректальном раке (Sonvilla et al., Br J Cancer, 2010; 102(7):1145-1156). Более того, экспрессию FGFR3 наблюдали при плоскоклеточном раке легких (Liao et al (2013), Cancer Research, 73(16): 5195-5205).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления четвертого аспекта настоящего изобретения, опосредованное Т-клетками заболевание выбрано из ревматоидного артрита (RA), индуцированного коллагеном II артрита, рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE), псориаза, ювенильного диабета, болезни Шегрена, заболевания щитовидной железы, саркоидоза, аутоиммунного увеита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона и язвенного колита), целиакии и тяжелой миастении.

Вышеперечисленные заболевания являются неограничивающими примерами конкретных опосредованных Т-клетками заболеваний, которые можно лечить путем ингибирования FGFR3.

В данном описании упомянут ряд документов, в том числе патентные заявки и руководства пользователя от производителя. Раскрытие этих документов, при этом не считающихся релевантными в отношении патентоспособности настоящего изобретения, включено в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. Более конкретно, все указанные в ссылках документы включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был специально и отдельно указан, как включенный посредством ссылки.

Для всего настоящего изобретения термин "включающий" означает, что охватываются все перечисленные элементы. При использовании данного термина также могут присутствовать дополнительные, безымянные элементы. Таким образом, "включающий" может означать "состоящий из" (т.е. присутствуют только перечисленные элементы) или он может означать "содержащий" (т.е. также присутствуют другие элементы помимо всех перечисленных элементов). Так, полипептид, включающий SEQ ID NO: x, может либо состоять только из SEQ ID NO: x, либо может в других вариантах осуществления содержать дополнительные аминокислоты, как например в слитом белке, например, в вариантах осуществления, где SEQ ID NO: x слит с тяжелой или легкой цепью антитела.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понятны специалисту обычной квалификации в данной области, к которой относится настоящее изобретение. В случае противоречий патентное описание, в том числе определения, будет иметь преимущественную силу.

Что касается вариантов осуществления, охарактеризованных в данном описании, в частности в формуле изобретения, то предполагается, что каждый вариант осуществления, упомянутый в зависимом пункте формулы изобретения, объединен с каждым вариантом осуществления каждого пункта (независимого или зависимого) формулы изобретения, от которого зависит указанный зависимый пункт формулы изобретения. Например, в случае независимого пункта 1 формулы изобретения, в котором указаны 3 альтернативы A, B и C, в зависимом пункте 2 формулы изобретения, в котором указаны 3 альтернативы D, E и F, и в пункте 3 формулы изобретения, который зависит от пунктов 1 и 2 формулы изобретения и в котором указаны 3 альтернативы G, H и I, следует понимать, что описание однозначно раскрывает варианты осуществления, соответствующие комбинациям A, D, G; A, D, H; A, D, I; A, E, G; A, E, H; A, E, I; A, F, G; A, F, H; A, F, I; B, F, H; B, F, I; C, D, G; C, D, H; C, D, I; C, E, G; C, E, H; C, E, I; C, F, G; C, F, H; C, F, I, если конкретно не указано иное.

Аналогично, а также в тех случаях, когда в независимых и/или зависимых пунктах формулы изобретения не указаны альтернативы, подразумевают, что если зависимые пункты формулы изобретения ссылаются на большинство предыдущих пунктов формулы изобретения, любая комбинация объекта изобретения, охватываемая ими, считается явно раскрытой. Например, в случае независимого пункта 1 формулы изобретения, зависимого пункта 2, ссылающегося на пункт 1, и зависимого пункта 3, ссылающегося на оба пункта 2 и 1 формулы изобретения, следует, что комбинация объекта изобретения согласно пунктам 3 и 1 является ясной и недвусмысленно раскрытой, как и комбинация объекта изобретения согласно пунктам 3, 2 и 1 формулы изобретения. В случае наличия дополнительного зависимого пункта 4 формулы изобретения, который ссылается на любой из пунктов 1-3, следует, что четко и однозначно раскрыта комбинация объекта изобретения согласно пунктам 4 и 1, пунктам 4, 2 и 1, пунктам 4, 3 и 1, а также пунктам 4, 3, 2 и 1 формулы изобретения.

Приведенные выше соображения с соответствующими поправками применимы ко всем прилагаемым пунктам формулы изобретения.

На фигурах показано.

Фиг. 1 - выравнивание финомеров, связывающих FGFR3, из SEQ ID NO: 3-8.

Фиг. 2 - свойства интернализации финомеров, связывающих FGFR3.

Фиг. 3 - графики эксклюзионной хроматографии по размеру для Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов: A) FF2L4C3 - SEQ ID NO: 3; B) FF44L65G12 - SEQ ID NO: 4; C) FF44L65G7 - SEQ ID NO: 5; D) FF48L66G7 - SEQ ID NO: 6; E) FF43L65D5 - SEQ ID NO: 7; F) FF44L65B7 - SEQ ID NO: 8.

Фиг. 4 - FACS-связывание Fyn SH3-производных полипептидов, связывающихся с FGFR3, с: A) FGFR3-положительными клетками KMS-11 и B) FGFR3-отрицательными клетками N87.

Фиг. 5 - ELISA в отношении специфичности для Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов: A) FF2L4C3 - SEQ ID NO: 3; B) FF44L65G12 - SEQ ID NO: 4; C) FF44L65G7 - SEQ ID NO: 5; D) FF48L66G7 - SEQ ID NO: 6; E) FF43L65D5 - SEQ ID NO: 7; F) FF44L65B7 - SEQ ID NO: 8. Протестированные антигены: huFGFR3b=сплайс-вариант b FGFR3 человека; huFGFR3c=сплайс-вариант с FGFR3 человека; cyFGFR3c=сплайс-вариант с FGFR3 яванского макака; muFGFR3c=сплайс-вариант с мышинного FGFR3; huFGFR3-D1=домен 1 FGFR3 человека; huFGFR3-D2=домен 2 FGFR3 человека; huFGFR3-D1D2=домен 1 и домен 2 FGFR3 человека; IgG=смесь поликлональных IgG человека; PBS=фосфатно-солевой буферный раствор.

Фиг. 6 - анализ интернализации, демонстрирующий цитотоксический эффект Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов.

Настоящее изобретение иллюстрируют примеры.

Пример 1. Fyn SH3-производные полипептиды, связывающиеся с FGFR3b и FGFR3c.

Для возможности целенаправленного воздействия на FGFR3 была предпринята попытка получить конкретные Fyn SH3-производные связывающие молекулы к ним. Поскольку распределение и экспрессия двух разных сплайс-вариантов (FGFR3b и FGFR3c) на разных опухолевых клетках до конца не изучены, важно, чтобы Fyn SH3-производные полипептиды могли связывать их оба.

С применением рекомбинантного FGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12) и FGFR3c-Fc человека (SEQ ID NO:

13) в качестве мишеней, успешно были отобраны и выделены несколько семейств Fyn SH3-производных связывающих белков, которые были способны связываться с обоими сплайс-вариантами FGFR3 человека (SEQ ID NO: 9 и 10). Дальнейшие исследования продолжали с наиболее перспективным семейством-кандидатом.

Интересно то, что Fyn SH3-производный полипептид, также называемый FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3), несущий последовательность RT-петли "EYVGPTP" (SEQ ID NO: 2), увеличивался в содержании в процессе отбора и демонстрировал наиболее перспективные свойства интернализации среди 29 протестированных финомеров, связывающих FGFR3 (см. фиг. 2). Более подробно, 5 других семейств последовательностей были исключены из дальнейшего анализа. Финомеры, принадлежащие к наиболее перспективному семейству последовательностей, демонстрировали наилучшие значения аффинности и свойства интернализации.

Для получения Fyn SH3-производных связывающихся с FGFR3 молекул с более высокими значениями аффинности и улучшенными свойствами интернализации использовали FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3) в качестве матрицы для созревания аффинности. Последовательность RT-петли "EYVGPTP" (SEQ ID NO: 2) сохраняли неизменной и объединяли с рандомизированным репертуаром n-src-петель (где отрезок из 4-6 рандомизированных аминокислотных остатков был введен в положения от (X¹) до (X⁴) в SEQ ID NO: 1). Процесс создания библиотеки для созревания аффинности был фактически таким же, как описано для клонирования не подвергавшейся воздействию библиотеки с рандомизированной n-src-петлей ("библиотека 0", которая описана в [25]).

После отборов не подвергавшихся воздействию молекул и молекул для созревания аффинности увеличенные в содержании Fyn SH3-производные полипептиды подвергали скринингу на связывание с FGFR3 с помощью ELISA лизата. ДНК, кодирующие Fyn SH3-производные связывающие белки, клонировали в бактериальный вектор экспрессии pQE12 (Qiagen) так, чтобы полученные конструкции несли C-концевую тус-гексагистидиновую метку, как описано в Grabulovski et al. [26]. Полипептиды экспрессировались в цитозоле бактерий E.coli в 96-луночном формате, и 200 мкл осветленного лизата на лунку получали так, как описано в Bertschinger et al. [27]. Вкратце, трансформированные бактериальные колонии брали из чашки с агаром и выращивали в круглодонном 96-луночном планшете (Nunc, кат. № 163320) в 200 мкл среды 2xYT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,1% (вес./об.) глюкозы. Экспрессию белка индуцировали после роста в течение 3 ч при 37°C и вихревом встряхивании на 200 об/мин, путем добавления 1 mM IPTG (Applichem, Германия). Белки экспрессировались в течение ночи на роторном шейкере (200 об/мин., 30°C). Затем 96-луночный планшет центрифугировали при 1800 g в течение 10 мин. и удаляли надосадочную жидкость. Бактериальные осадки лизировали с помощью Bug-Buster® плюс Benzonase® (Millipore 70750-3), а затем лизаты осветляли центрифугированием в течение 10 мин. при 1800×g. Смешивали 60 мкл лизата со 170 мкл PBS и фильтровали через фильтровальную пластину Multiscreen с размером пор 0,45 мкм (Millipore MSHVN4510) для удаления какого-либо оставшегося бактериального дебриса.

Лизаты из моноклональных бактерий использовали для ELISA. Для ELISA на планшеты Maxisorp наносили покрытие в течение ночи посредством либо 5 мкг/мл huFGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12), 5 мкг/мл huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13), либо 5 мкг/мл поли-IgG и блокировали в течение по меньшей мере 1 ч. посредством 2% MPBS. Осветленные лизаты, содержащие растворимый финомер с C-концевой меткой тус и гексагистидиновой пептидной меткой, вносили в 2% MPBS, содержащий мышинное моноклональное антитело к метке тус, клон 9E10 (Roche Applied Science 11 667 203 001), в планшеты Maxisorp. Связанный финомер выявляли посредством 9E10 с помощью конъюгата пероксидазы хрена и антитела лошади к IgG мыши (Sigma-Aldrich A2554). Выявление активности пероксидазы осуществляли добавлением субстрата BM blue POD (Roche), и реакцию останавливали добавлением 1 M H₂SO₄.

Последовательность ДНК специфических связывающих молекул подтверждали секвенированием ДНК.

Результаты.

Аминокислотные последовательности положительных по результатам ELISA предпочтительных Fyn SH3-производных полипептидов, связывающихся с FGFR3b и FGFR3c, представлены под SEQ ID NO: 3-8, которые прилагаются в перечне последовательностей. Fyn SH3-производные полипептиды SEQ ID NO: 4-8 были следствием отбора связывающих молекул из большого пула молекул, которые были получены после созревания аффинности FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3), и представлены в данном примере из-за их улучшенных значений аффинности и свойств интернализации (как показано в примерах 2 и 5).

Более подробно, для более чем 80 финомеров, полученных из SEQ ID NO: 3, проводили анализ характеристик в отношении их биофизических свойств, значений аффинности и свойств интернализации. SEQ ID NO: 4-8 являлись связывающими молекулами с наилучшим набором свойств с точки зрения биофизики, аффинности и интернализации.

Пример 2. Экспрессия Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов по настоящему изобретению.

В данном примере показаны выходы в результате экспрессии предпочтительных Fyn SH3-

производных FGFR3-связывающих полипептидов и результаты анализа характеристик этих полипептидов с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру.

Способы.

а) Выходы в результате экспрессии Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов.

Fyn SH3-производные FGFR3-связывающие полипептиды экспрессировали в цитозоле бактерий TGI E.coli и очищали так, как описано у Grabulovski et al. [2].

б) Эксклюзионная хроматография по размеру (SEC).

Образцы анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (TOSOH TSKgel PW G3000PWxL; Agilent 1260 Infinity HPLC; подвижная фаза: PBS, pH 7,4). 10 мкл неразбавленного образца вводили инъекцией в колонку и анализировали полученные профили.

Результаты.

а) Выходы экспрессии.

Выходы экспрессии для мономерных Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов по настоящему изобретению варьировали в диапазоне от 15 до 51 мг/литр бактериальной культуры в неоптимизированных условиях во встряхиваемых колбах (табл. 1) и находились в типичном диапазоне для полученного из SH3 Fyn полипептида.

Таблица 1. Выходы экспрессии Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов, полученных в бактериях TGI E.coli

Финомер	SEQ ID NO	Выход (мг/л)
FF2L4C3	3	18
FF44L65G12	4	37
FF44L65G7	5	15
FF48L66G7	6	58
FF43L65D5	7	32
FF44L65B7	8	51

б) Эксклюзионная хроматография по размеру (SEC).

Профили эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) продемонстрировали, что все конструкции элюировались преимущественно в виде одиночных мономерных пиков (фиг. 3). Обычно это свидетельствовало о хороших биофизических свойствах, что является преимуществом с точки зрения производства финомеров (Fyn SH3-производных связывающих молекул, в том числе финомабов, которые представляют собой слитые белки с антителами), и согласовывалось с более ранними наблюдениями для Fyn SH3-производных молекул.

Пример 3. Fyn SH3-производные полипептиды по настоящему изобретению связываются с FGFR3b и FGFR3c человека с высокими значениями аффинности.

В данном примере показан анализ характеристик предпочтительных Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов с помощью экспериментов с поверхностным плазмонным резонансом и проточной цитометрией.

Способы.

а) Измерения аффинности с помощью BIAcore.

Значения аффинности измеряли с помощью устройства BIAcore T200. Одну проточную ячейку на чипе S серии CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) покрывали антителом 9E10 к мус (Roche 1166203001; плотность покрытия в диапазоне от 6000 до 8000 RU) с помощью набора для аминного связывания (GE Healthcare BR100633).

Исходный финомер FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3) в концентрации 500 нМ и финомеры с SEQ ID NO: 4-8 в концентрации 100 нМ захватывали на поверхности 9E10 с последующими инъекциями различных концентраций huFGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12), huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) или супоFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 14) (0 нМ, 3,9 нМ, 7,8 нМ, 15,6 нМ, 31,25 нМ, 62,5 нМ, 125 нМ, 250 нМ и 500 нМ для измерений исходного финомера FF2L4C3, 0 нМ, 0,046 нМ, 0,14 нМ, 0,41 нМ, 1,2 нМ, 3,7 нМ, 11,1 нМ, 33,3 нМ и 100 нМ для финомеров с SEQ ID NO: 4-8). Регистрировали сенсограммы, и кажущиеся константы кинетики определяли путем подбора аппроксимирующей кривой с использованием модели взаимодействия Ленгмюра 1.1 в программном обеспечении BIAevaluation 2.1.

б) Измерения аффинности с помощью проточной цитометрии.

Связывание финомеров с huFGFR3 на клетках анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием клеток KMS-11 (JCRB1179) в качестве FGFR3-положительных клеток и N87 (ATCC, CRL-5822) в качестве контрольной линии FGFR3-отрицательных клеток. Клетки как KMS-11, так и N87 поддерживали в среде RPMI1640 (Invitrogen 52400-25). Все среды дополняли 25 ед./мл пенициллина, 25 мкг/мл стрептомицина и 10% FCS. Для сбора наполовину прикрепившихся клеток KMS-11 из колбы T150 надосадочную жидкость забирали в пробирку Falcon объемом 50 мл, и клетки промывали посредством 10 мл PBS, который также добавляли в пробирку Falcon. В колбу вносили 2 мл аккумулята (Sigma

A6964) и инкубировали в течение 10 мин. при 37°C. Аккутазу инактивировали добавлением 10 мл среды и вносили в пробирку Falcon, которую затем центрифугировали (250×g, 5 мин.) для осаждения клеток. Клетки ресуспендировали в буфере для FACS (PBS+1% FCS+0,2% азида натрия) до концентрации клеток 1×10⁶ клеток/мл и использовали 100 мкл на лунку (1×10⁵ клеток/лунка) для окрашивания при проточной цитометрии в 96-луночном круглом планшете (Nunc 163320). В случае прикрепившихся клеток N87 забирали надосадочную жидкость и смыв, и собирали и получали только клетки, открепленные с помощью аккутазы.

Финомеры совместно инкубировали с антителом мыши к тус (клон 9E10; Roche 11667149001) для обеспечения сшивания меченых посредством тус финомеров перед связыванием с клетками. Финомеры разбавляли до 1 мкМ и совместно инкубировали с 667 нМ антитела 9E10 к тус (молярное соотношение 3:2) в буфере для FACS в течение примерно 10 мин на льду.

Эту смесь серийно разбавляли 1 к 4 до концентрации финомеров 0,06 нМ (всего 8 концентраций). Контроли включали только вторичное антитело 9E10 (без финомера; 667 нМ 9E10), только клетки (только буфер для FACS) и антитело к FGFR3 (R&D systems; кат. № MAB766) в концентрации 10 нМ. Клетки центрифугировали в 96-луночном планшете (250 мкг, 5 мин.) и ресуспендировали с указанными выше образцами перед инкубацией на льду в течение 1 ч. Планшет центрифугировали и промывали (PBS+0,2% азида натрия) перед повторным центрифугированием. Затем 50 мкл вторичного антитела к mIgG с Alexa488 (Life Technologies A21202) добавляли к клеткам в концентрации 4 мкг/мл перед инкубацией в темноте на льду в течение 45 мин. Планшет центрифугировали и дважды промывали PBS+0,2% азида натрия перед ресуспендированием в буфере для FACS и FACS-анализом (Millipore Guava easyCyte 8HT).

Анализ данных FACS проводили с помощью Prism 6. Данные преобразовывали ($X = \log X$) и анализировали с помощью нелинейной аппроксимации $\log(\text{агонист})$ относительно ответа - переменный угловой коэффициент (4 параметра).

Результаты.

а) Измерения аффинности с помощью BIAcore.

Свойства связывания анализировали с помощью анализа взаимодействий в режиме реального времени на чипе BIAcore с выявлением следующих констант диссоциации (KD) для выбранных FGFR3-связывающих полипептидов.

Таблица 2. Кажущиеся константы кинетики связывания Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов с рекомбинантными FGFR3b человека, FGFR3c человека и FGFR3c яванского макака

Финомер	SEQ ID NO.	KD _{кажущ.} huFGFR3b (пМ)	KD _{кажущ.} huFGFR3c (пМ)	KD _{кажущ.} cyFGFR3c (пМ)
FF2L4C3	3	4700	4600	5900
FF44L65G12	4	690	685	110
FF44L65G7	5	470	335	280
FF48L66G7	6	260	190	210
FF43L65D5	7	335	230	160
FF44L65B7	8	100	250	260

Измеренные кажущиеся значения аффинности (табл. 2) Fyn SH3-производных полипептидов (SEQ ID NO: 3-8), связывающихся с FGFR3b и FGFR3c (SEQ ID NO: 9 и 10), были на удивление высокими, если учитывать тот факт, что субнанолярные значения были получены лишь после одного цикла созревания аффинности. Более того, эти результаты измерений подтверждали сравнимые свойства связывания у Fyn SH3-производных полипептидов (SEQ ID NO: 3-8) с обеими человеческими изоформами FGFR3 (FGFR3b и FGFR3c; SEQ ID NO: 9 и 10), и с FGFR3c яванского макака (связывание с FGFR3b яванского макака не тестировали).

б) Измерения аффинности с помощью проточной цитометрии.

Свойства связывания анализировали с помощью проточной цитометрии с применением FGFR3-положительных клеток KMS-11 и FGFR3-отрицательных клеток N87 в качестве отрицательного контроля. Приведенные далее значения EC50 для избранных FGFR3-связывающих полипептидов измеряли так, как показано в табл. 3 и на фиг. 4.

Таблица 3. Значения EC50, определенные на FGFR3-положительных клетках KMS-11 для Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов

Финомер	SEQ ID NO	EC50 (нМ)
FF2L4C3	3	5,9
FF44L65G12	4	2,2
FF44L65G7	5	4,2
FF48L66G7	6	2,3
FF43L65D5	7	1,2
FF44L65B7	8	0,6

Значения EC50 в низком наномолярном диапазоне (табл. 3), измеренные на линии клеток, экспрессирующих FGFR3 (фиг. 4А, KMS-11), подтверждали высокие значения кажущейся аффинности, измеренные с помощью поверхностного плазмонного резонанса (табл. 2), и демонстрировали связывания с FGFR3 в природном контексте клеточной поверхности. Все Fyn SH3-производные полипептиды (SEQ ID NO: 3-8), связывающиеся с FGFR3, не демонстрировали неспецифического связывания на линии клеток, не экспрессирующей FGFR3 (фиг. 4В).

Пример 4. Fyn SH3-производные полипептиды по настоящему изобретению, специфичные к FGFR3, не препятствуют связыванию с лигандом.

Было бы предпочтительно, чтобы Fyn SH3-производные полипептиды для связывания с обеими изоформами FGFR3b и FGFR3c не препятствовали связыванию с лигандом (например, FGF1), поскольку сайт связывания с лигандом расположен вблизи сайта сплайсинга, который дает в результате либо FGFR3b, либо FGFR3c.

С целью проверки способности Fyn SH3-производных полипептидов связываться с FGFR3 в присутствии одного из его лигандов ставили эксперимент с BIAcore для измерения аффинности финомеров к FGFR3 в условиях присутствия или отсутствия FGF1 (фактор 1 роста фибробластов является одним из основных лигандов FGFR3).

По аналогии со способом, использованным для измерения значений аффинности (который описан в примере 3), финомеры в концентрации 100 нМ (за исключением FF2L4C3 - SEQ ID NO: 3, который использовали в концентрации 500 нМ) захватывали на поверхности 9E10 с последующими инъекциями различных концентраций huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) (0 нМ, 11 нМ, 33 нМ, 100 нМ) в условиях присутствия или в отсутствия 200 нМ FGF1 (R&D systems 232-FA-025/CF). Регистрировали сенсограммы и рассчитывали кажущиеся константы кинетики с помощью программного обеспечения BIAevaluation 2.1.

Результаты.

Независимо от присутствия или отсутствия 200 нМ FGF1 в растворе, связывание Fyn SH3-производных полипептидов с huFGFR3c оставалось неизменным, что демонстрировало то, что связывание финомеров с FGFR3 не препятствовало связыванию с лигандом.

Таблица 4. Показаны константы кинетики, полученные в условиях присутствия или отсутствия 200 нМ FGF1

Финомер	SEQ ID NO.	KD _{кажущ.} (нМ) с	KD _{кажущ.} (нМ) с
		huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13)	huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) в присутствии 200 нМ FGF1
FF2L4C3	3	4000	3800
FF44L65G12	4	140	120
FF44L65G7	5	320	230
FF48L66G7	6	170	130
FF43L65D5	7	60	70
FF44L65B7	8	170	130

Даже несмотря на то, что из-за погрешности анализа значения KD_{кажущ.} в отсутствие FGF1 слегка отличались от значений, полученных в эксперименте, показанном в примере 2 (табл. 2), этот эксперимент продемонстрировал, что Fyn SH3-производные полипептиды способны связываться с FGFR3, даже если лиганд связан с сайтом связывания с лигандом (в данном случае FGF1).

Из этого авторы изобретения сделали вывод о том, что эпитоп, связываемый Fyn SH3-производными полипептидами, описанными в данном документе, расположен в константной области FGFR3.

Пример 5. Fyn SH3-производные полипептиды по настоящему-изобретению связываются с доменами D1-D2 у FGFR3.

Специфичность Fyn SH3-производных полипептидов, связывающихся с FGFR3, тестировали с помощью ELISA.

На планшет (планшет Maxisorp; Nunc 439454) наносили различные антигены: huFGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12), huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13), cyFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 14), muFGFR3c-His (SEQ ID NO: 15), huD1-Fc (SEQ ID NO: 16), huD2-Fc (SEQ ID NO: 17), huD1-D2-Fc (SEQ ID NO: 18).

На планшет наносили покрытие со 100 мкл антигена в концентрации 5 мкг/мл (0,5 мкг/лунка) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки промывали 3х посредством PBS, а затем блокировали 200 мкл 4% MPBS в течение 1 ч. при к.т. Лунки снова промывали и добавляли 20 мкл 10% MPBS, содержащего 15 мкг/мл 9E10, перед добавлением 80 мкл финомера в количестве 250 нМ (конечная концентрация финомера 200 нМ). Лунки инкубировали в течение 45 мин при к.т. перед промыванием и добавлением 100 мкл антитела к IgG мыши-HRP (Sigma A2554), разбавленного 1:1000 в 2% MPBS. Лунки инкубировали в течение 30 мин при к.т. перед промыванием 3х с помощью 0,1% Tween-20 в PBS, а затем 3х PBS. Вносили 100 мкл субстрата BM POD Blue (Roche 11484281001) в каждую лунку с последующим добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ для остановки реакции. Поглощение в диапазоне 450-650 нм регистрировали с помощью устройства Tecan M1000.

Результаты.

Как показано на фиг. 5 A-F, все Fyn SH3-производные полипептиды были перекрестно-реактивными с FGFR3с яванского макака и мышиных. Что интересно, все связывающие молекулы были специфичными к эпитопу, присутствующему только в случае если домены D1 и D2 физически связаны (см. фиг. 5, A-F, столбец huFGFR3-D1D2), фактически связывание не наблюдалось, если на планшете для ELISA были иммобилизованы отдельные домены D1 или D2 (hFGFR3-D1 или huFGFR3-D2).

Пример 6. Fyn SH3-производные полипептиды по настоящему изобретению обуславливали эффективную интернализацию FGFR3.

Интернализация является центральным признаком Fyn SH3-производных полипептидов, описанных в данном документе, и обеспечивает возможность применять эти связывающие молекулы для внутриклеточной доставки токсичных полезных грузов и/или слитых белков, таких как антитела.

Для оценки способности Fyn SH3-производных полипептидов, связывающихся с FGFR3, интернализироваться при связывании с мишенью, проводили анализ интернализации по внутриклеточной доставке цитотоксического средства.

С помощью этого анализа на клетках KMS-11 измеряли цитотоксический эффект финомеров, связывающих FGFR3, сшитых с MMAF (монометилауристин F), который конъюгирован с 9E10. MMAF представляет собой антимиотическое средство (блокирует полимеризацию тубулина) и активен только при интернализации в клетки. Следовательно, этот анализ свидетельствовал о том, насколько хорошо финомер способствует интернализации MMAF. Высевали 50 мкл клеток KMS-11 в количестве 2×10⁵ клеток/мл в 96-луночный плоскодонный планшет (Corning Costar 3610) с получением 10000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение 4 ч, давая возможность клеткам прикрепиться (37°C, 5% CO₂). Финомеры и 9E10-MMAF смешивали в соотношении 3:1. Получали 4х исходный раствор финомера (4 мкМ) и 4х исходный раствор 9E10-MMAF (1,33 мкМ) в средах RPMI (см. раздел 5.4.1) и смешивали 1:1 (40 мкл+40 мкл). Затем эту смесь последовательно разбавляли 1 к 3 с получением диапазона концентраций 1000 нМ-50 пМ. Добавляли 50 мкл образца к 50 мкл клеток (которые были высеяны ранее) и инкубировали в течение 5 дней (37°C, 5% CO₂). Были включены соответствующие контроли: финомер дикого типа FynSH3, MMAF-9E10 без финомера, а также клетки без добавления каких-либо реагентов. Все образцы получали в двух повторностях. Спустя 5 дней 100 мкл клеточного титра glo (Promega G7573) добавляли в каждую лунку и инкубировали при легком встряхивании в течение 10 мин. в темноте. В качестве показаний считывания для жизнеспособности клеток измеряли люминесценцию с помощью устройства Tecan M1000. Анализ проводили с помощью Prism 6. Данные преобразовывали (X=logX) и анализировали с помощью нелинейной аппроксимации log(ингибитор) относительно ответа переменной угловой коэффициент (4 параметра).

Результаты.

Все описанные в данном документе Fyn SH3-производные FGFR3-связывающие полипептиды продемонстрировали повышенную цитотоксичность (например, интернализацию) в сравнении с клетками, обработанными только MMAF-меченым вторичным антителом (9E10 на фиг. 6A) или финомером дикого типа FynSH3 в комбинации с MMAF-меченым 9E10, показанным во всех 3 экспериментах (фиг. 6 A-C, указано как FynSH3), который демонстрировал цитотоксичность только в наиболее высокой протестированной концентрации, вероятно из-за токсичности собственно MMAF. На фиг. 6 показаны профили цитотоксичности, полученные в различных экспериментах, и в табл. 5 показаны EC50, полученные для различных Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов.

Таблица 5. Значения EC50, определенные в анализах интернализации с использованием FGFR3+ клеток KMS-11, для Fyn SH3-производных FGFR3-связывающих полипептидов

Финомер	SEQ ID NO.	EC50 (нМ)
FF2L4C3	3	28,5/21/26,4
FF44L65G12	4	2,5
FF44L65G7	5	2,6
FF48L66G7	6	2,4
FF43L65D5	7	0,8
FF44L65B7	8	1,8

Примечание: для FF2L4C3 указаны 3 значения, полученные в 3 экспериментах, показанных на фиг. 6. Данные, показанные на фиг. 6 и в табл. 5, демонстрируют, что повышенная аффинность также приводит к более эффективной интернализации.

Пример 7. Альтернативный Fyn SH3-производный полипептид, который продемонстрировал превосходные свойства связывания и интернализации и который получен из другого семейства.

Помимо предпочтительного семейства последовательностей (SEQ ID NO: 1) был выявлен один альтернативный финомер FF40L54A5 (SEQ ID NO: 22), который неожиданно также продемонстрировал превосходные свойства связывания и интернализации и имел сходные технологические свойства и свойства перекрестной реактивности с финомерами, полученными из SEQ ID NO: 1 (см. табл. 6). Не ожидалось, что финомер FF40L54A5 будет обладать превосходными свойствами интернализации, поскольку его последовательность получена из финомера, который продемонстрировал лишь очень слабые свойства интернализации.

В табл. 6 подытожены свойства финомера FF40L54A5.

Таблица 6

Финомер	SEQ ID NO.	Выход (мг/л)	Значения аффинности, измеренные с помощью BIAcore			
			KD _{кажущ.} huFGFR3b (пМ)	KD _{кажущ.} huFGFR3c (пМ)	KD _{кажущ.} cyFGFR3c (пМ)	
FF40L54A5	22	5,4	170	170*	160	
Финомер	SEQ ID NO.	EC50 (нМ) для связывания с FGFR3+ клетками KMS-11	Значения аффинности, измеренные с помощью BIAcore (конкуренция с FGF1)		EC50 (нМ) в анализе интернализации	
			KD _{кажущ.} (пМ) с huFGFR3c-Fc	KD _{кажущ.} (пМ) с huFGFR3c-Fc в присутствии 200 нМ FGF1		
FF40L54A5	22	6,6	210*	230	4,7	
Финомер	SEQ ID NO.	ELISA в отношении специфичности				
		Перекрестная реактивность с cyFGFR3c	Перекрестная реактивность с muFGFR3c	Связывание с доменом D1 у huFGFR3	Связывание с доменом D2 у huFGFR3	Связывание с доменами D1-D2 у huFGFR3
FF40L54A5	22	+++	+++	-	-	+++

* различия из-за экспериментальной погрешности.

Ссылки

1. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(2): p. 116-29.
2. Kalff, A. and A. Spencer, *The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies*. Blood Cancer J, 2012. **2**: p. e89.
3. Pollett, J.B., et al., *Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3819-21.
4. Fonseca, R., et al., *Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4569-75.
5. Agazie, Y.M., et al., *The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3*. Oncogene, 2003. **22**(44): p. 6909-18.
6. Ronchetti, D., et al., *Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations*. Oncogene, 2001. **20**(27): p. 3553-62.
7. Chesi, M., et al., *Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma*. Blood, 2001. **97**(3): p. 729-36.

8. Plowright, E.E., et al., *Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 992-8.
9. Chen, J., et al., *Constitutively activated FGFR3 mutants signal through PLCgamma-dependent and -independent pathways for hematopoietic transformation*. *Blood*, 2005. **106**(1): p. 328-37.
10. Li, Z., et al., *The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2413-9.
11. Trudel, S., et al., *Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma*. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3521-8.
12. Trudel, S., et al., *CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2941-8.
13. Chen, J., et al., *FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies*. *Oncogene*, 2005. **24**(56): p. 8259-67.
14. Paterson, J.L., et al., *Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(5): p. 595-603.
15. Grand, E.K., et al., *Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074*. *Leukemia*, 2004. **18**(5): p. 962-6.
16. Gomez-Roman, J.J., et al., *Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 459-65.
17. Tomlinson, D.C., et al., *FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer*. *J Pathol*, 2007. **213**(1): p. 91-8.
18. van Rhijn, B.W., et al., *Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma*. *J Pathol*, 2002. **198**(2): p. 245-51.
19. Tomlinson, D.C., C.D. Hurst, and M.A. Knowles, *Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(40): p. 5889-99.
20. Martinez-Torrecuadrada, J., et al., *Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with*

human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6280-90.

21. Martinez-Torrecuadrada, J.L., et al., Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 862-73.

22. Rauchenberger, R., et al., Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38194-205.

23. Brack, S., et al., A bispecific HER2-targeting FynomAb with superior antitumor activity and novel mode of action. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(8): p. 2030-9.

24. Silacci, M., et al., Discovery and characterization of COVA322, a clinical-stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. MAbs, 2016. **8**(1): p. 141-9.

25. Schlatter, D., et al., Generation, characterization and structural data of chymase binding proteins based on the human Fyn kinase SH3 domain. MAbs, 2012. **4**(4): p. 497-508.

26. Grabulovski, D., M. Kaspar, and D. Neri, A novel, non-immunogenic Fyn SH3-derived binding protein with tumor vascular targeting properties. J Biol Chem, 2007. **282**(5): p. 3196-204.

27. Bertschinger, J., D. Grabulovski, and D. Neri, Selection of single domain binding proteins by covalent DNA display. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(2): p. 57-68.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, связывающийся с изоформами 3b и 3c рецептора 3 фактора роста фибробластов (FGFR3b и FGFR3c), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(a) GVTLFVALYDYEVYGPTPMLSFNHKGKGFQIL (X¹) (X²) (X³) (X⁴) GPYWEA RSL (X⁵) TGETG (X⁶) IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1);

где аминокислотные положения от (X¹) до (X⁶) могут представлять собой любую аминокислотную последовательность; и

(b) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (a), где при определении идентичности исключаются аминокислотные положения от (X¹) до (X⁶), и при условии, что аминокислотная последовательность EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) в аминокислотных положениях 12-19 из SEQ ID NO: 1 является консервативной, и аминокислоты Р и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 1 являются консервативными;

(c) GVTLFVALYDYEVMSSTALSFNHKGKGFQILSQSPHQYWEARSLTGETG (X⁶) IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 19),

где аминокислотное положение (X⁶) может представлять собой любую аминокислоту; и

(d) аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности из (c), где при определении идентичности исключается аминокислотное положение (X⁶), и при условии, что аминокислотные последовательности EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) в аминокислотных положениях 12-18 из SEQ ID NO: 19 и SQSPH (SEQ ID NO: 21) в аминокислотных положениях 31-35 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными, и аминокислоты Q и Y в аминокислотных положениях 37 и 38 из SEQ ID NO: 19 являются консервативными.

2. Полипептид по п.1, где

(X¹) представляет собой N, R или K и предпочтительно представляет собой R или K;

(X²) представляет собой S, G, K или R и предпочтительно представляет собой G, K или R;

(X³) представляет собой S или G и предпочтительно представляет собой G;

(X⁴) представляет собой E, Q, D, S или K и предпочтительно представляет собой Q, D, S или K;

(X⁵) представляет собой T или A; и

(X⁶) представляет собой Y, W или L и предпочтительно представляет собой L или W.

3. Полипептид по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 3-8 и 22.

4. Полипептид по п.3, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 22.

5. Слитая конструкция, содержащая полипептид по любому из пп.1-4, слитый с дополнительным соединением, где дополнительное соединение представляет собой токсичное соединение.

6. Слитая конструкция, содержащая полипептид по любому из пп.1-4, слитый с дополнительным соединением, где дополнительное соединение содержит легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела, Fc-домен антитела, антитело или их комбинацию.

7. Слитая конструкция по п.6, где антитело направлено против мишени, выбранной из группы, состоящей из GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, V7H3 и CEACAM-1.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-4.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитую конструкцию по п.6 или 7.

10. Две или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие слитую конструкцию по п.6 или 7.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-4, слитую конструкцию по любому из пп.5-7, молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или 9, две или более молекул нуклеиновой кислоты по п.10 или любую их комбинацию.

12. Диагностическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-4, слитую конструкцию по любому из пп.5-7, молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или 9, две или более молекул нуклеиновой кислоты по п.10 или любую их комбинацию.

13. Применение фармацевтической композиции по п.11 в лечении рака или опосредованного Т-клетками заболевания.

14. Применение по п.13, где рак выбран из рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, эндометриального рака, глиомы, рака головы и шеи, рака печени, рака легкого, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака яичка и уротелиального рака.

15. Применение по п.13, где рак выбран из множественной миеломы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, плоскоклеточного рака легкого и колоректального рака.

16. Применение по п.13, где опосредованное Т-клетками заболевание выбрано из ревматоидного артрита (RA), индуцированного коллагеном II артрита, рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE), псориаза, ювенильного диабета, болезни Шегрена, заболевания щитовидной железы, саркоидоза, аутоиммунного увеита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона и язвенного колита), целиакии и тяжелой миастении.

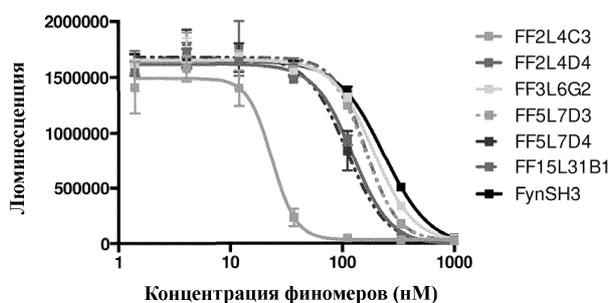
Множественное выравнивание последовательностей CLUSTAL O(1.2.4)

```

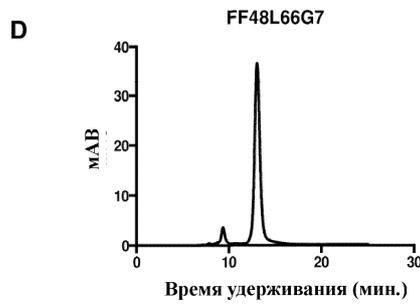
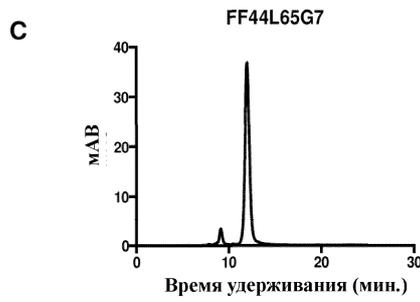
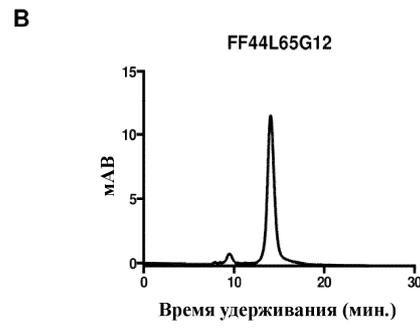
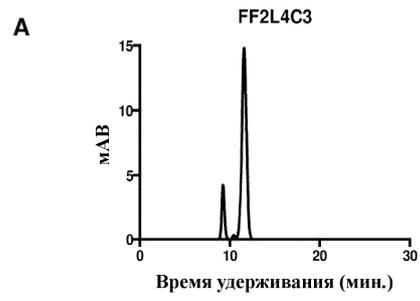
3   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILNSSEGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
7   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILRKKGKGPYWEARSLATGETGLIPSNYVAPVDSIQ
4   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILRGGQGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
5   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILRGGDGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
6   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILKGGSGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
8   GVTLFVALYDYEVYGP TPMLSFHKGEKFQILRRGSGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
*****

```

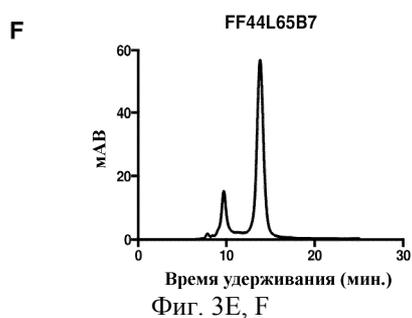
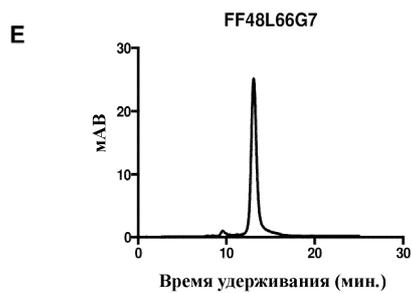
Фиг. 1



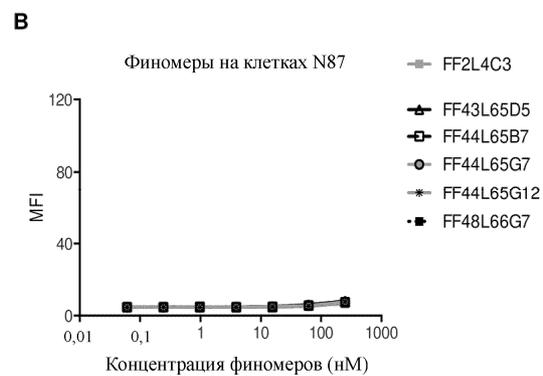
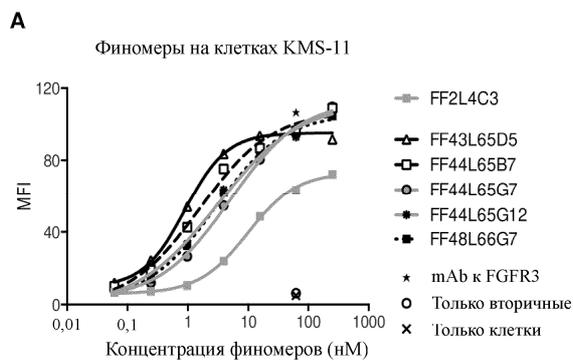
Фиг. 2



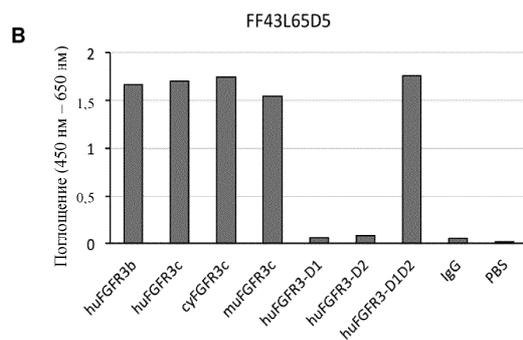
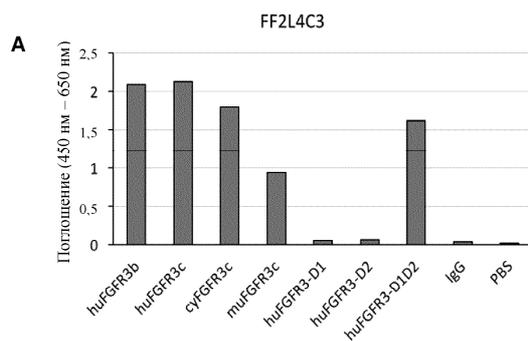
Фиг. 3А, В, С, D



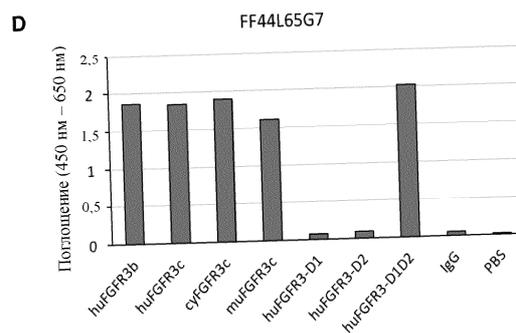
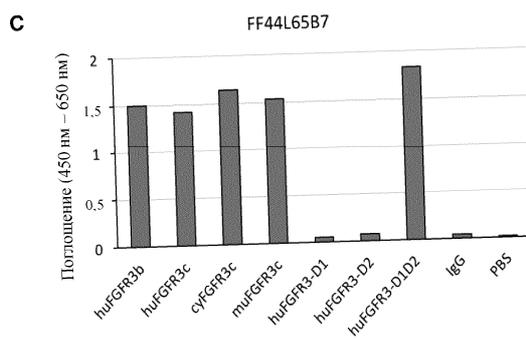
Фиг. 3E, F



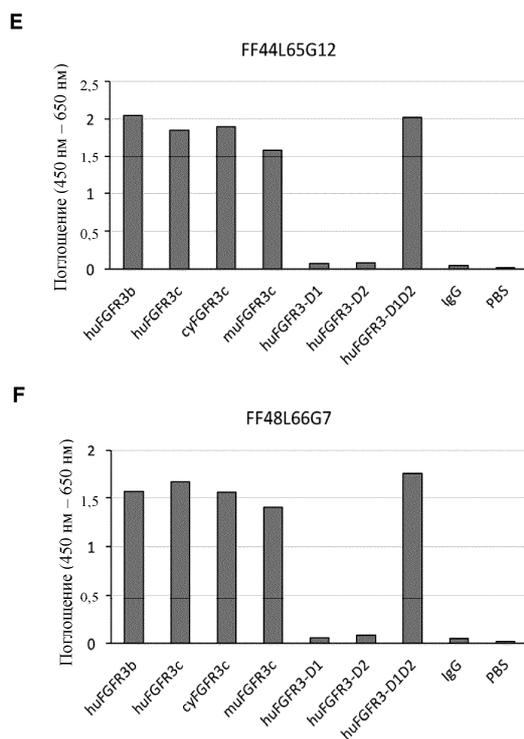
Фиг. 4



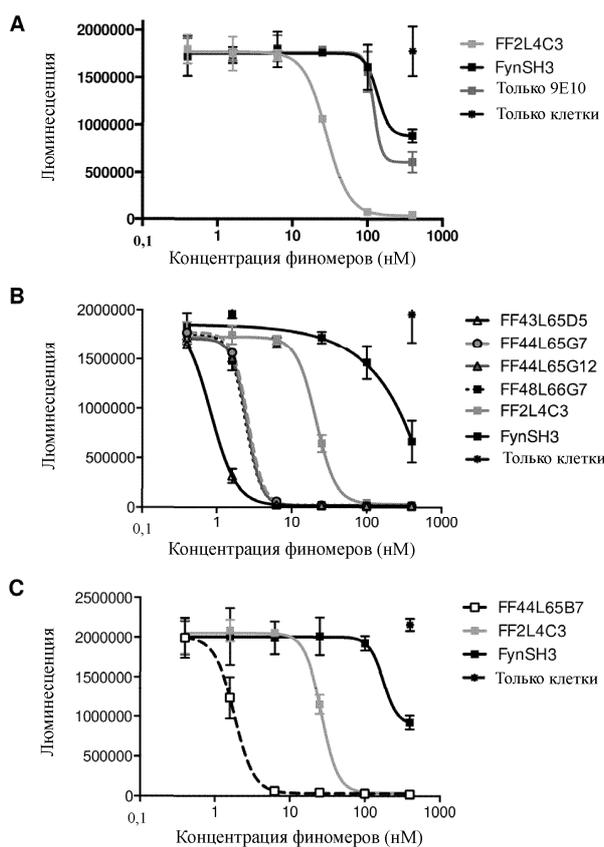
Фиг. 5А, В



Фиг. 5С, D



Фиг. 5E, F



Фиг. 6

