

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042548**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.27**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/39** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201991561**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.09.12**

---

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

---

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

**(56)** WO-A1-2012088006

**(32)** 2012.09.13; 2013.03.13

WO-A1-2010070094

**(33)** US

**(43)** 2020.03.31

**(62)** 201590543; 2013.09.12

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

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

**(74)** Представитель:  
**Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

---

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

---

**B1****042548****042548****B1**

### Ссылка на родственные заявки

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

### Область техники

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

### Уровень техники

Миостатин, также известный как фактор-8 роста и дифференцировки (GDF-8), представляет собой представителя суперсемейства трансформирующих факторов роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) секретируемых факторов роста. Миостатин характеризуется всеми структурными особенностями, общими для белков семейства TGF- $\beta$ : гидрофобным аминоконцом, который действует как секреторный сигнал, девятью инвариантными остатками цистеина и протеолитическим сайтом процессинга типа фурин "RXXR". Протеолитическое расщепление белка приводит к образованию С-концевого домена, который образует гомодимер, который представляет собой биологически активную форму миостатина (Thies et al., Growth Factors 2001; 18(4):251-9). Выравнивания С-концевого фрагмента аминокислотных последовательностей миостатина от множественных видов позвоночных показывают, что белок характеризуется высокой консервативностью (100% идентичностью) между человеком, обезьяной, коровой, собакой, мышью, крысой, индейкой и курицей (McPherron, et al. PNAS, 94:12457-61, 1997).

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

Увеличение массы и силы скелетных мышц также связано с метаболическими адаптациями, которые положительно влияют на конституцию, расход энергии, гомеостаз глюкозы и потребность в инсулине. Как генетические, так и фармакологические данные показывают, что миостатин регулирует энергетический метаболизм и что его ингибирование может значительно ослаблять прогрессирование заболеваний обмена веществ, включающих в себя ожирение и сахарный диабет. Например, миостатиновые нулевые мыши проявляют уменьшенное накопление жира в организме (McPherron & Lee, J. JCI 109: 595, 2002), по сравнению с мышами дикого типа того же возраста. Это сокращение жира в организме представляет собой проявление уменьшенного количества и размера адипоцитов, подразумевая значительную роль миостатина в адипогенезе, а также в миогенезе. Соответственно, миостатин представляет собой желательную мишень для терапевтического или профилактического вмешательства для лечения нарушений или состояний, которые бы получили пользу от увеличения мышечной массы, силы мышц и/или метаболизма (например, мышечная дистрофия, слабость, дисфункциональная атрофия и кахексия), нарушений, связанных с атрофией мышц (например, почечная недостаточность, сердечная недостаточность или заболевание и заболевание печени) и нарушений обмена веществ (например, сахарный диабет типа II, метаболический синдром, ожирение и остеоартрит).

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

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии аднектинов, которые связываются с и представляют собой антагонистов миостатина. В частности, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют активность миостатина, тем самым оказывая влияние на последующую передачу сигналов SMAD. Один механизм учета измененной передачи сигналов SMAD некоторых антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению включает в себя ингибирование вовлечения Alk4 в комплекс миостатин-ActRIIb, физиологические последствия которого увеличивают объем мышц и вес тела. Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен полипептид, содержащий десятый домен фибронектина типа III (<sup>10</sup>Fn3), причем <sup>10</sup>Fn3 содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли человеческого домена Fn3, и причем полипептид связывается с миостатином. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид связывается с миостатином с K<sub>D</sub>, составляющей менее чем 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC полипептида согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, где (a) X<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из S, T и Y; (b) X<sub>2</sub> выбирают из группы, состоящей из H, Y, N, R, F, G, S и T; (c) X<sub>3</sub> выбирают из группы, состоящей из A, P, Q, S, F, H, N и R; (d) X<sub>4</sub> выбирают из группы, состоящей из G и A; (e) X<sub>5</sub> выбирают из группы, состоящей из H, L, R, V, N, D, F, I и K; (f) X<sub>6</sub> выбирают из группы, состоящей из A, L, G, M, F, I и V и (g) X<sub>7</sub> выбирают из группы, состоящей из H и N. Согласно некоторым вариантам осуществления X<sub>1</sub> представляет собой S, и/или X<sub>2</sub> представляет собой H или Y, и/или X<sub>3</sub> представляет собой A или P, и/или X<sub>4</sub> представляет собой G, и/или X<sub>5</sub> представляет собой H, L или R, и/или X<sub>6</sub> представляет собой A или L, и/или X<sub>7</sub> представляет собой N.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G-X<sub>8</sub>, где X<sub>8</sub> представляет собой V или L.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG полипептида согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>-X<sub>18</sub>, причем (a) X<sub>9</sub> выбирают из группы, состоящей из L, V и I; (b) X<sub>10</sub> выбирают из группы, состоящей из T и S; (c) X<sub>11</sub> выбирают из группы, состоящей из K, R, A, G, S, D, H, N, T и P; (d) X<sub>12</sub> выбирают из группы, состоящей из S, T, A, E, H, K и N; (e) X<sub>13</sub> выбирают из группы, состоящей из K, G, Q, D, E, N, T и S; (f) X<sub>14</sub> выбирают из группы, состоящей из V, I, F, L, M, P, T и Y; (g) X<sub>15</sub> выбирают из группы, состоящей из I, L и Y; (h) X<sub>16</sub> выбирают из группы, состоящей из H, I, V, K, L, R, F, G, S и T; (i) X<sub>17</sub> выбирают из группы, состоящей из Y и H; и (j) X<sub>18</sub> выбирают из группы, состоящей из K, M, L, R и V.

Согласно некоторым вариантам осуществления X<sub>9</sub> представляет собой L или V, и/или X<sub>10</sub> представляет собой T, X<sub>11</sub> представляет собой K или R, и/или X<sub>12</sub> представляет собой S или T, и/или X<sub>13</sub> представляет собой K, G или Q, и/или X<sub>14</sub> представляет собой V или I, и/или X<sub>15</sub> представляет собой I, и/или X<sub>16</sub> представляет собой H, I или V, и/или X<sub>17</sub> представляет собой Y и/или X<sub>18</sub> представляет собой K или M. Согласно другим вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X<sub>25</sub>-X<sub>26</sub>-R-X<sub>27</sub>-G-X<sub>28</sub>-X<sub>29</sub>-X<sub>30</sub>-X<sub>31</sub>-X<sub>32</sub>, причем (a) X<sub>25</sub> выбирают из группы, состоящей из I и V; (b) X<sub>26</sub> выбирают из группы, состоящей из F, D и Y; (c) X<sub>27</sub> выбирают из группы, состоящей из D и T; (d) X<sub>28</sub> выбирают из группы, состоящей из P, M, V и T; (e) X<sub>29</sub> выбирают из группы, состоящей из V, L, N, R и S; (f) X<sub>30</sub> выбирают из группы, состоящей из H, T, L, N, Q и S; (g) X<sub>31</sub> выбирают из группы, состоящей из F, W, Y, H и L; и (h) X<sub>32</sub> выбирают из группы, состоящей из D, A и G.

Согласно некоторым вариантам осуществления X<sub>25</sub> представляет собой I, и/или X<sub>26</sub> представляет собой F, и/или X<sub>27</sub> представляет собой D, и/или X<sub>28</sub> представляет собой P, и/или X<sub>29</sub> представляет собой V, и/или X<sub>30</sub> представляет собой H или T, и/или X<sub>31</sub> представляет собой F или W, и/или X<sub>32</sub> представляет собой D.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC полипептида содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38. Согласно другим вариантам осуществления петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45. Согласно еще другим вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последователь-

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

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

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

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $X_{33}\text{-L-P-X}_{34}\text{-X}_{35}\text{-X}_{36}\text{-X}_{37}\text{-X}_{38}\text{-X}_{39}$ , где  $X_{33}$  представляет собой T или Y;  $X_{34}$  представляет собой Y, N, R, F, G, S или T;  $X_{35}$  представляет собой A, P, S, F, H, N или R;  $X_{36}$  представляет собой A;  $X_{37}$  представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I;  $X_{38}$  представляет собой L, G, M, F, I или V и  $X_{39}$  представляет собой H, и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $X_{41}\text{-X}_{42}\text{-X}_{43}\text{-X}_{44}\text{-X}_{45}\text{-X}_{46}\text{-X}_{47}\text{-X}_{48}\text{-X}_{49}\text{-X}_{50}$ , где  $X_{41}$  представляет собой L или I;  $X_{42}$  представляет собой S;  $X_{43}$  представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P;  $X_{44}$  представляет собой S, A, E, H, K или N;  $X_{45}$  представляет собой K, Q, D, E, N, T или S;  $X_{46}$  представляет собой V, I, F, L, M, P или T;  $X_{47}$  представляет собой I или Y;  $X_{48}$  представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T;  $X_{49}$  представляет собой H и  $X_{50}$  представляет собой M, L, R или V. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $G\text{-R-G-X}_{40}$ , где  $X_{40}$  представляет собой L, и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $X_{41}\text{-X}_{42}\text{-X}_{43}\text{-X}_{44}\text{-X}_{45}\text{-X}_{46}\text{-X}_{47}\text{-X}_{48}\text{-X}_{49}\text{-X}_{50}$ , где  $X_{41}$  представляет собой L или I;  $X_{42}$  представляет собой S;  $X_{43}$

представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P;  $X_{44}$  представляет собой S, A, E, H, K или N;  $X_{45}$  представляет собой K, Q, D, E, N, T или S;  $X_{46}$  представляет собой V, I, F, L, M, P или T;  $X_{47}$  представляет собой I или Y;  $X_{48}$  представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T;  $X_{49}$  представляет собой H и  $X_{50}$  представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля BC содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, и петля DE содержит 1 аминокислотную замену, такую как консервативная аминокислотная замена, и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $X_{33}$ -L-P- $X_{34}$ - $X_{35}$ - $X_{36}$ - $X_{37}$ - $X_{38}$ - $X_{39}$ , где  $X_{33}$  представляет собой T или Y;  $X_{34}$  представляет собой Y, N, R, F, G, S или T;  $X_{35}$  представляет собой A, P, S, F, H, N или R;  $X_{36}$  представляет собой A;  $X_{37}$  представляет собой H, L, R, V, N, D, F или I;  $X_{38}$  представляет собой L, G, M, F, I или V и  $X_{39}$  представляет собой H; петля DE характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле G-R-G- $X_{40}$ , где  $X_{40}$  представляет собой L; и петля FG характеризуется аминокислотной последовательностью, соответствующей формуле  $X_{41}$ - $X_{42}$ - $X_{43}$ - $X_{44}$ - $X_{45}$ - $X_{46}$ - $X_{47}$ - $X_{48}$ - $X_{49}$ - $X_{50}$ , где  $X_{41}$  представляет собой L или I;  $X_{42}$  представляет собой S;  $X_{43}$  представляет собой K, R, A, G, S, H, N, T или P;  $X_{44}$  представляет собой S, A, E, H, K или N;  $X_{45}$  представляет собой K, Q, D, E, N, T или S;  $X_{46}$  представляет собой V, I, F, L, M, P или T;  $X_{47}$  представляет собой I или Y;  $X_{48}$  представляет собой H, I, V, L, R, F, G, S или T;  $X_{49}$  представляет собой H и  $X_{50}$  представляет собой M, L, R или V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, и содержит аминокислотные замены в петлях BC, DE и FG, которые позволяют полипептиду поддерживать связывание с миостатином. Такие аминокислотные замены могут быть определены, например, глубоким мутационным сканированием, как описано в примере 8. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю BC, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , где  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L, M и V;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G и S;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y. Согласно более предпочтительному варианту осуществления  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из F, S и W;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, и L; и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из H, N и Q. Согласно конкретному варианту осуществления  $X_{51}$  представляет собой S;  $X_{52}$  представляет собой L;  $X_{53}$  представляет собой P;  $X_{54}$  представляет собой H;  $X_{55}$  представляет собой Q;  $X_{56}$  представляет собой G;  $X_{57}$  представляет собой K;  $X_{58}$  представляет собой A;  $X_{59}$  представляет собой N. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю DE, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- $X_{60}$ , где  $X_{60}$  представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V. Согласно предпочтительному варианту осуществления  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M и V. Согласно конкретному варианту осуществления  $X_{60}$  представляет собой V.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , где  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y;  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{69}$  выбирают из груп-

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

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

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

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

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

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

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению не конкурируют за связывание с миостатином с ActRIIB. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению конкурируют за связывание с миостатином с ALK4 и/или ALK5. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные выше полипептиды могут содержать один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, такие как полиэтиленгликоль, сиаловая кислота, Fc, фрагмент Fc, трансферрин, сывороточный альбумин, связывающий сывороточный альбумин белок и связывающий сывороточный иммуноглобулин белок. Согласно одному варианту осуществления фрагмент ПК представляет собой связывающий сывороточный альбумин белок, который содержит домен  $^{10}\text{Fn3}$ , который связывается, например, с HSA. Согласно другому варианту осуществления фрагмент ПК представляет собой Fc и может находиться либо на N-, либо на C-конце полипептида, и необязательно образовывать димер. Согласно другим вариантам осуществления фрагмент ПК представляет собой полиэтиленгликоль. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент ПК и полипептид связаны с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи, пептидной связи, полипептида, сахара или полимерного полиэтиленгликолевого фрагмента.

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

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

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта путем введения эффективного количества полипептида или содержащей описанный выше полипептид композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления подлежащее лечению заболевание представляет собой мышечную дис-

трофию, боковой амиотрофический склероз, миозит с включенными тельцами (IBM), застойное обструктивное заболевание легких, хроническую сердечную недостаточность, злокачественную опухоль, СПИД, почечную недостаточность, хроническое заболевание почек, уремию, ревматоидный артрит, саркопению, атрофию мышц из-за длительного постельного режима, травму спинного мозга, инсульт, перелом костей, старение, диабет, ожирение, гипергликемию, кахексию, остеоартрит, остеопороз, инфаркт миокарда или фиброз.

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

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

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ ослабления или ингибирования нарушения обмена веществ у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение обмена веществ представляет собой сахарный диабет (например, сахарный диабет типа II), гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию, резистентность к инсулину, нарушение метаболизма глюкозы, липодистрофию, ожирение или метаболический синдром. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть введена вторая терапевтическая композиция.

Согласно другим вариантам осуществления введение полипептида приводит к повышенной чувствительности к инсулину, повышенному поглощению глюкозы клетками, снижению уровня глюкозы в крови и/или снижению жира в организме.

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

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

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

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрены способы обнаружения или измерения миостатина в образце, включающие контактирование образца с описанным выше полипептидом и обнаружение или измерение связывания полипептида с миостатином.

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

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

#### **Краткое описание графических материалов**

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

На фиг. 2 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли BC семейства 1979\_B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли BC, которые изменялись во время PROfusion. Изображение было создано с использованием WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004; 14:1188-1190).

На фиг. 3 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли DE семейства 1979B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли DE,



которые изменялись во время PROfusion.

На фиг. 4 изображен основанный на WebLogo анализ различных остатков петли FG семейства 1979B06 антимиостатиновых аднектинов. Указана частота аминокислот в каждом положении петли FG, которые изменялись во время PROfusion.

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

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

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

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

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

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

На фиг. 11 изображен график, показывающий влияние различных концентраций аднектинов PRD-1285, PRD-1286 и PRD-1288 на миостатиновую активность в ARE-люциферазном анализе. Экспериментальные условия описаны в примере 3. Каждый из PRD-1285, PRD-1286 и PRD-1288 ингибировал на 100% индуцированную миостатином ARE-люциферазную активность.

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

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

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

На фиг. 15 изображена диаграмма, показывающая увеличение объема мышц ног (в  $см^3$ ) на 15 день у мышей, получавших указанные антимиостатиновые аднектины, в сравнении с контрольными мышами. Мышам B6 SCID вводили либо раз в две недели, либо еженедельно подкожные инъекции антимиостатиновых аднектинов в течение 14 дней, как описано в примере 13. (\*= указывает на статистические отличия от соответствующей контрольной группы,  $p \leq 0,01$  t-критерий).

На фиг. 16 изображена диаграмма, показывающая увеличение объема мышц ног (в  $см^3$ ) на 28 день у мышей, получавших различные указанные дозы PRD-1474. Мышам B6 SCID вводили либо раз в две недели, либо еженедельно подкожные инъекции PRD-1474 в течение 28 дней, как описано в примере 14 (\* $p < 0,0001$ ; # не достоверно между группами).

### Подробное описание настоящего изобретения

#### Определения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины характеризуются тем же значением, что и обычно понимаемое специалистом в настоящей области техники. Хотя любые способы и композиции, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы в практике или при исследовании настоящего изобретения, предпочтительные способы и композиции описаны в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин "полноразмерный миостатин" относится к полноразмерной полипептидной последовательности, описанной в McPherron et al. (1997), выше, а также родственным полноразмерным полипептидам, включающим в себя аллельные варианты и межвидовые гомологи. Термин "миостатин" или "зрелый миостатин" относится к фрагментам биологически активного зрелого миостатина, а также родственным полипептидам, включающим в себя аллельные варианты, варианты сплайсинга и слитые пептиды и полипептиды. Сообщалось, что зрелый С-концевой белок характеризуется 100% идентичностью последовательности среди многих видов, включающих в себя человека, мышь, курицу, свинью, индейку и крысу (Lee et al., PNAS 2001; 98:9306). Последовательность человеческого препромиостатина представляет собой:

MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAI  
KIQLSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT  
TETITMPTESDFLMQVDGPKKCCFFKFSSKIYQNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFV  
QILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLD MNPGTGIWQSIDVKT VLNWLKQPESNLGIEIK  
ALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRY  
PLTVDFEAFGWDWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQNPRGSAGPCC  
TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 1)

Последовательность человеческого про-миостатина представляет собой:

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQLSKLRLETAPNISKDVIRQLL  
PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQVDGPKKCC  
FFKFSSKIYQNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLD  
MNPGTGIWQSIDVKT VLNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNP  
FLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIAPKRYKAN  
YCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQNPRGSAGPCC TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKI  
PAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 2)

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

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYP  
HTHLVHQNPRGSAGPCC TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ  
ID NO: 3).

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

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

"Выделенный" полипептид представляет собой тот, который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды пред-

ставляют собой вещества, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим применениям полипептида и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Согласно предпочтительным вариантам осуществления полипептид будет очищен (1) до более чем 95% по массе полипептида, как определено по способу Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания Кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Выделенный полипептид включает в себя полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент природной среды полипептида не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид будет подготовлен по меньшей мере путем одной стадии очистки. "Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в настоящем документе определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в настоящей области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого программного обеспечения, как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR™). Специалисты в настоящей области техники могут легко определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая в себя любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А по сравнению с или по отношению к данной последовательности В (которая альтернативно может быть сформулирована как данная аминокислотная последовательность А, которая содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом: 100 кратная фракция X/Y, где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании этой программой А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Следует иметь в виду, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А.

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

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

Связывающий аднектин сайт для антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению может быть определен путем применения стандартных техник, обычно используемых для картирования эпитопов антител, включающих в себя без ограничения протеазное картирование и мутационный анализ. Альтернативно, связывающий аднектин сайт может быть определен путем конкурентного анализа с использованием эталонного аднектина или антитела, которое связывается с тем же полипептидом, например, миостатином (как дополнительно описано ниже в разделе "Перекрестно конкурирующие аднектины и/или аднектины, которые связываются с тем же связывающим аднектин сайтом". Если иссле-

двум аднектин и эталонная молекула (например, другой аднектин или антитело) конкурируют, тогда они связываются с тем же связывающим аднектин сайтом или связывающими аднектин сайтами достаточно близко, чтобы связывание одной молекулы мешало другой.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

примера, абсорбцию, распределение, метаболизм и элиминацию субъектом. Используемый в настоящем документе термин "белок РК модуляции" или "РК фрагмент" относится к любому белку, пептиду или фрагменту, который влияет на фармакокинетические свойства биологически активной молекулы при слиянии или введении вместе с биологически активной молекулой. Примеры белка РК модуляции или РК фрагмента включают в себя ПЭГ, связывающие человеческий сывороточный альбумин (HSA) (как описано в публикации США № 2005/0287153 и 2007/0003549, публикации РСТ № WO 2009/083804 и WO 2009/133208), человеческий сывороточный альбумин, Fc или Fc-фрагменты и их варианты, а также сахара (например, сиаловую кислоту). "Период полураспада" аминокислотной последовательности или соединения в общем случае может быть определен как время, необходимое для сывороточной концентрации полипептида для уменьшения на 50%, *in vivo*, например, из-за деградации последовательности или соединения и/или клиренса или секвестрации последовательности или соединения природными механизмами. Период полураспада можно определить любым способом, известным *per se*, например, путем фармакокинетического анализа. Подходящие техники будут понятны специалисту в настоящей области техники и могут, например, как правило, включать в себя стадии соответствующего введения субъекту подходящей дозы аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению; сбор образцов крови или других образцов от субъекта через постоянные промежутки времени; определение содержания или концентрации аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению в указанном образце крови; и вычисление из (кривой зависимости) полученных таким образом данных, времени, пока содержание или концентрация аминокислотной последовательности или соединения согласно настоящему изобретению было уменьшено на 50%, по сравнению с исходным содержанием при дозировании. Эталон получают, например, по стандартным справочникам, таким как Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Reference is also made to Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Период полураспада может быть выражен с использованием таких параметров, как  $t_{1/2}$ -альфа,  $t_{1/2}$ -бета,  $HL\_Lambda\_z$  и площадь под кривой (AUC). В настоящем описании "увеличение периода полураспада" относится к увеличению любого одного из этих параметров, любых двух из этих параметров, любых трех из этих параметров или всех этих четырех параметров. "Увеличение периода полураспада", в частности, относится к увеличению  $t_{1/2}$ -бета и/или  $HL\_Lambda\_z$ , с или без увеличения  $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или того и другого.

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

Термин "терапевтически эффективное количество" относится по меньшей мере к минимальной дозе, но меньшей, чем токсическая доза, средства, которое необходимо субъекту для получения терапевтической пользы. Например, терапевтически эффективное количество антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, приводит к одному или нескольким из следующего: увеличению объема мышц и/или мышечной силы, снижению жира тела, увеличению чувствительности к инсулину или лечению состояний, при которых присутствие миостатина вызывает или способствует нежелательному патологическому эффекту или снижению уровня миостатина приводит к полезному терапевтическому эффекту. Используемый в настоящем документе термин "ослабленный" или "слабость" относится к состоянию, которое может быть охарактеризовано двумя или более симптомами из-за слабости, потери веса, замедленной подвижности, усталости, низкого уровня активности, плохой выносливости и нарушения поведенческой реакции на сенсорные сигналы. Один признак слабости представляет собой "саркопению" или возрастную потерю мышечной массы.

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

### Обзор

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

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

### I. Основанные на фибронектине каркасные элементы

Согласно одному аспекту настоящей заявки предусмотрены антимииостатиновые аднектины, содержащие домен Fn3, в котором одна или несколько доступных для растворителей петель была рандомизирована или мутирована. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fn3 представляет собой домен Fn3, происходящий от десятого модуля дикого типа домена человеческого фибронектина типа III (<sup>10</sup>Fn3):

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTA

TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 4)

(петли BC, DE и FG подчеркнуты).

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

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

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антимииостатиновый аднектин представляет собой полипептид <sup>10</sup>Fn3, который по меньшей мере на 40%, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичен человеческому домену <sup>10</sup>Fn3, представленному в SEQ ID NO: 4. Большая часть изменчивости, как правило, происходит в одной или нескольких петлях. Каждая из бета или бета-подобных цепей полипептида <sup>10</sup>Fn3 может состоять по существу из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности соответствующей бета или бета-подобной цепи SEQ ID NO: 4, при условии, что такое изменение не нарушает стабильность полипептида в физиологических условиях.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимииостатиновый аднектин, содержащий десятый домен фибронектина типа III (<sup>10</sup>Fn3), причем домен <sup>10</sup>Fn3 содержит петлю AB; петлю BC; петлю CD; петлю DE; петлю EF и петлю FG; и содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG с измененной аминокислотной последовательностью относительно последовательности соответствующей петли человеческого домена <sup>10</sup>Fn3. Согласно некоторым вариантам осуществления антимииостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению содержат домен <sup>10</sup>Fn3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90,

95, 98, 99 или 100% идентичную областям непетли SEQ ID NO: 4, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, изменена. Согласно некоторым вариантам осуществления петли BC и FG изменены, и согласно некоторым вариантам осуществления петли BC, DE и FG изменены, т.е. домены <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 содержат не встречающиеся в природе петли. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены петли AB, CD и/или EF. Под "изменены" подразумевают одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по отношению к последовательности шаблона (соответствующему домену фибронектина человека) и включает в себя аминокислотные добавки, делеции, замены или их комбинации. Изменение аминокислотной последовательности может быть достигнуто путем преднамеренного, слепого или спонтанного изменения последовательности, как правило, последовательности кодирующей нуклеиновой кислоты, и может происходить любым способом, например, ПЦР, подверженной ошибкам ПЦР или химического синтеза ДНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько петель, выбранные из BC, DE и FG, может быть продлена или сокращена по длине по отношению к соответствующей петле фибронектина человека. Согласно некоторым вариантам осуществления длина петли может быть продлена на 2-25 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления длина петли может быть уменьшена посредством 1-11 аминокислот. Для оптимизации связывания антигена, следовательно, длина петли <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 может быть изменена в длину, а также в последовательности, чтобы получить максимально возможную гибкость и сродство в связывании антигена.

Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит домен F<sub>n</sub>3, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную областям без петель SEQ ID NO: 4, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, DE и FG, изменяется. Согласно некоторым вариантам осуществления измененная петля BC содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления измененная петля DE содержит до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислотных вставок или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислотных делеций, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных вставок или их комбинации.

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению основаны на каркасном элементе <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 и определяются, как правило, следующей последовательностью:

EVVAAT(Z)<sub>a</sub>SLLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGE(Z)<sub>b</sub>QEFTV(Z)<sub>y</sub>ATI(Z)<sub>c</sub>DYTITVYAV(Z)<sub>z</sub>ISINYRT

(SEQ ID NO: 5),

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

Альтернативно, антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению основаны на каркасном элементе <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 и определяются, как правило, с помощью последовательности:

EVVAATPTSLLI(Z)<sub>x</sub>YYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)<sub>y</sub>ATISGLKPGVDYTITVYAV(Z)

ISINYRT (SEQ ID NO: 6)

где петля BC представлена с помощью (Z)<sub>x</sub>, петля DE представлена с помощью (Z)<sub>y</sub> и петля FG представлена с помощью (Z)<sub>z</sub>. Z представляет собой любую аминокислоту, а индекс после Z представляет собой целое число количества аминокислот. В частности, x, y и z каждый независимо может составлять от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 8, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 5 до 8, от 6 до 20, от 6

до 15, от 6 до 10, от 6 до 8, от 2 до 7, от 5 до 7 или от 6 до 7 аминокислот. Согласно предпочтительным вариантам осуществления  $x$  составляет 11 аминокислот,  $y$  составляет 6 аминокислот и  $z$  составляет 12 аминокислот. Последовательности бета цепей могут содержать в пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замен, делеций или добавлений по всем 7 каркасным областям относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности бета цепей могут содержать в пределах от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 консервативных замен во всех 7 каркасных областях относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные остатки сердцевин фиксируются и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят в остатках, отличных от аминокислотных остатков сердцевин.

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

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

Подобным образом, положения 51 (P) и 56 (T) петли DE, как показано в SEQ ID NO: 4, не нуждаются в модификации для связывания с миостатином. Т.е., домены  $^{10}\text{Fn3}$  с высокой аффинностью связывания с миостатином могут быть получены путем модификации только остатков 52-55 петли DE, как показано в SEQ ID NO: 4. Это показано в петлях DE, примеры которых приведены в табл. 1, которые указывают на то, что только остатки, охватывающих подчеркнутые положения, были изменены. Кроме того, положения 76 (T) и 87 (P) петли FG, как показано в SEQ ID NO: 1, не нуждаются в модификации для связывания с миостатином. Т.е. домены  $^{10}\text{Fn3}$  с высокой аффинностью связывания с миостатином могут быть получены путем модификации только остатков 77-86 петли FG, как показано в SEQ ID NO: 4. Это показано в петлях FG, примеры которых приведены в табл. 1, которые указывают на то, что только остатки, охватывающих подчеркнутые положения, были изменены. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления области петель BC, DE и FG антимиостатинных аднектинов согласно настоящему изобретению могут быть описаны в соответствии с консенсусными последовательностями. Эти консенсусные последовательности проиллюстрированы с помощью петель BC, DE и FG, показанных в табл. 1, и согласно анализу WebLogo (фиг. 2-7). (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004; 14:1188-1190, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Анализ WebLogo создает аминокислотную сигнатуру, отражающую частоту аминокислот в каждом измененном положении петли BC, DE или FG. Например, согласно некоторым вариантам осуществления петля BC,  $(Z)_x$ , определяется консенсусной последовательностью  $X_1\text{-L-P-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7$ , где  $X_1$  представляет собой S, T или Y;  $X_2$  представляет собой H, Y, N, R, F, G, S или T;  $X_3$  представляет собой A, P, Q, S, F, H, N или R;  $X_4$  представляет собой G или A;  $X_5$  представляет собой H, L, R, V, N, D, F, I или K;  $X_6$  представляет собой A, L, G, M, F, I или V и  $X_7$  представляет собой H или N. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38. Согласно одному варианту осуществления петля BC содержит аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE,  $(Z)_y$ , определяется консенсусной последовательностью  $G\text{-R-G-X}_8$ , где  $X_8$  представляет собой V или L. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля DE содержит аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42. Согласно одному варианту осуществления петля DE содержит аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 39.

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

Согласно другим вариантам осуществления петля BC,  $(Z)_x$ , определяется консенсусной последова-



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

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

Согласно другим вариантам осуществления петля FG,  $(Z)_z$ , определяется консенсусной последовательностью  $X_{25}$ - $X_{26}$ -R- $X_{27}$ -G- $X_{28}$ - $X_{29}$ - $X_{30}$ - $X_{31}$ - $X_{32}$ , где  $X_{25}$  представляет собой I или V;  $X_{26}$  представляет собой F, D или Y;  $X_{27}$  представляет собой D или T;  $X_{28}$  представляет собой P, M, V или T;  $X_{29}$  представляет собой V, L, N, R или S;  $X_{30}$  представляет собой H, T, L, N, Q или S;  $X_{31}$  представляет собой F, W, Y, H или L и  $X_{32}$  представляет собой D, A или G. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антимиостатиновый аднектин, содержащий петлю BC,  $(Z)_x$ , содержащую последовательность  $X_1$ -L-P- $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ - $X_6$ - $X_7$ , и петлю DE,  $(Z)_y$ , содержащую последовательность G-R-G- $X_8$ , как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38, и петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42. Согласно одному варианту осуществления петли BC и DE содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 39 соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю BC,  $(Z)_x$ , содержащую последовательность  $X_1$ -L-P- $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ - $X_6$ - $X_7$ , и петлю FG,  $(Z)_z$ , содержащую последовательность  $X_9$ - $X_{10}$ - $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ - $X_{15}$ - $X_{16}$ - $X_{17}$ - $X_{18}$ , как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петли BC и FG содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 75 соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит петлю DE,  $(Z)_y$ , содержащую последовательность G-R-G- $X_8$ , и петлю FG,  $(Z)_z$ , содержащую последовательность  $X_9$ - $X_{10}$ - $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ - $X_{15}$ - $X_{16}$ - $X_{17}$ - $X_{18}$ , как определено выше. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79. Согласно одному варианту осуществления петли DE и FG содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39 и 75 соответственно.

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

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

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

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

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

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

Согласно иллюстративным вариантам осуществления описанный в настоящем документе антимиостатиновый аднектин определяется последовательность SEQ ID NO: 5 и содержит соответствующий набор последовательностей петель BC, DE и FG от любого из клонов, перечисленных в табл. 1. Например, клон 1979\_B06 в табл. 1 содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 7, 39 и 46 соответственно. Таким образом, основанный на этих петлях антимиостатиновый аднектин может содержать SEQ ID NO: 5 или 6, причем (Z)<sub>x</sub> содержит SEQ ID NO: 7, (Z)<sub>y</sub> содержит SEQ ID NO: 39 и (Z)<sub>z</sub> содержит SEQ ID NO: 46. Подобные конструкции предполагают использование набора петель BC, DE и FG от других клонов в табл. 1, или консенсусных последовательностей SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79 соответственно. Каркасные области таких антимиостатиновых аднектинов могут содержать приблизительно от 0 до 20, от 0 до 15, от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замен, консервативных замен, делеций или добавлений, по сравнению с каркасными аминокислотными остатками в SEQ ID NO: 4. Такие каркасные модификации могут быть сделаны при условии, что антимиостатиновый аднектин способен связываться с миостатином с желаемой K<sub>D</sub>. Согласно предпочтительным вариантам осуществления петля BC антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SWSLPHAGHVN (SEQ ID NO: 7), SWVSPRGRAR (SEQ ID NO: 8), SWEVPRGLAR (SEQ ID NO: 9), SWWAPLGLAR (SEQ ID NO: 10), SWTLPHAGLAN (SEQ ID NO: 11), SWYLPYAHMN (SEQ ID NO: 12), SWSLPPFAGHLN (SEQ ID NO: 13), SWSLPPYGLAN (SEQ ID NO: 14), SWSLPHAGHAH (SEQ ID NO: 15), SWTLPNFGLIN (SEQ ID NO: 16), SWTLPHAGRAH (SEQ ID NO: 17), SWSLPYAGHLN (SEQ ID NO: 18), SWSLPYAAHMN (SEQ ID NO: 19), SWSLPYPGHLN (SEQ ID NO: 20), SWSLPYAGHAH (SEQ ID NO: 21), SWDAPGGLAR (SEQ ID NO: 22), SWSLPTPGLAH (SEQ ID NO: 23), SWSLPHRGVAN (SEQ ID NO: 24), SWSLPSSGVAN (SEQ ID NO: 25), SWSLPHHGFGH (SEQ ID NO: 26), SWSLPHAGDAH (SEQ ID NO: 27), SWSLPHNGVAH (SEQ ID NO: 28), SWSLPRQGLAN (SEQ ID NO: 29), SWSLPGPGHGFH (SEQ ID NO: 30), SWSLPHPGLGH (SEQ ID NO: 31), SWDAPRGLAR (SEQ ID NO: 32), SWDAPAGLAR (SEQ ID NO: 33), SWSLPHQGKAN (SEQ ID NO: 34), SWDAPKGLAR (SEQ ID NO: 35), SWSLPNPGIAH (SEQ ID NO: 36), SWSLPRPGNAH (SEQ ID NO: 37) и SWSLPNPGNAH (SEQ ID NO: 38). Согласно некоторым вариантам осуществления петля BC антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 7-38, как показано в табл. 1. Согласно одному варианту осуществления петля BC содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: PGRGVT (SEQ ID NO: 39), PGRGST (SEQ ID NO: 40), LGRGST (SEQ ID NO: 41), PGRGLT (SEQ ID NO: 42), IGRGST (SEQ ID NO: 43), FGRGTT (SEQ ID NO: 44) и VGRGNT (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам осуществления петля DE антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 39-45, как показано в табл. 1. Согласно одному варианту осуществления петля DE содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 39. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: TLTKSQMIHYMP (SEQ ID NO: 46), TIYRDGMSHHDP (SEQ ID NO: 47), TVYRDGPLLLAP (SEQ ID NO: 48), TIFRTGMVQYDP (SEQ ID NO: 49), TLTNSEILYKP (SEQ ID NO: 50), TLTKSQLHHRP (SEQ ID NO: 51), TLTRSKIHYMP (SEQ ID NO: 52), TLTHSNIRYVP (SEQ ID NO: 53), TVSSTKVIVYLP (SEQ ID NO: 54), TITKSTIIYKP (SEQ ID NO: 55), TVTTTTSVILYKP (SEQ ID NO: 56), TLTKSQLIHYMP (SEQ ID NO: 57), TLTRSQVIHYMP (SEQ ID NO: 58), TLTKSKIIHYMP (SEQ ID NO: 59), TVSSTKVIHYKP (SEQ ID NO: 60), TLTKSKVIHYMP (SEQ

ID NO: 61), TVTTTKVIHYKP (SEQ ID NO: 62), TIDRDGVNHFAP (SEQ ID NO: 63), TVTTHGVIGYKP (SEQ ID NO: 64), TLTGANVVIYKP (SEQ ID NO: 35), TVTNTGVIIYKP (SEQ ID NO: 66), TVTATGIIYKP (SEQ ID NO: 67), TVTRAGFYRYKP (SEQ ID NO: 68), TVTREEVISYKP (SEQ ID NO: 69), TVTAAGVIIYKP (SEQ ID NO: 70), TVTANQPIIYKP (SEQ ID NO: 71), TITPETIIVYKP (SEQ ID NO: 72), TIDRDGTRSFD (SEQ ID NO: 73), TIFRDGPVTWDP (SEQ ID NO: 74), TVTDTGYLKYKP (SEQ ID NO: 75), TLTGSDTIFYKP (SEQ ID NO: 76), TVTGKDVIIYKP (SEQ ID NO: 77), TIFRDGVVNYGP (SEQ ID NO: 78) и TVTDTGFITYKP (SEQ ID NO: 79). Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению содержит подчеркнутый участок любой из SEQ ID NO: 46-79, как показано в табл. 1. Согласно одному варианту осуществления петля FG содержит подчеркнутый участок SEQ ID NO: 75. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит одну последовательность петли BC, выбранную из последовательностей петель BC, содержащих SEQ ID NO: 7-38 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 7-38, как показано в табл. 1; одну последовательность петли DE выбирают из последовательностей петель DE, содержащих SEQ ID NO: 39-45 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 39-45, как показано в табл. 1; и одну последовательность петли FG выбирают из последовательностей петель FG, содержащих SEQ ID NO: 46-79 или подчеркнутую часть любой из SEQ ID NO: 46-79, как показано в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность петли BC, DE и FG, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79 соответственно. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность петель BC, DE и FG, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную подчеркнутой части любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно, как показано в табл. 1.

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

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

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

EVVAATPTSLISWSLPHQKANYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKP

GVDTITVYAVTVTDTGYLKYKPISINYRT (SEQ ID NO: 331)

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

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, причем петля DE содержит 1 аминокислотную замену, например, консервативную аминокислотную за-



$X_{49}$  представляет собой H и  $X_{50}$  представляет собой M, L, R или V. Согласно одному варианту осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петли BC, DE и FG, как представлено в SEQ ID NO: 34, 39 и 75, соответственно, и содержит аминокислотные замены в петлях BC, DE и FG, которые позволяют антимиостатиновому аднектину поддерживать связывание с мио-статином. Такие аминокислотные замены могут быть определены, например, с помощью глубокого мутационного сканирования, как описано в примере 8. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю BC, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , где  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L, M и V;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G и S;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y. Согласно более предпочтительному варианту осуществления  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из F, S и W;  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y;  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G и L, и  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из H, N и Q.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю DE, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- $X_{60}$ , где  $X_{60}$  представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V. Согласно предпочтительному варианту осуществления  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M и V.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению содержит петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , где  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y. Согласно предпочтительному варианту осуществления  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V;  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y;  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y;  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y;  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из W и Y; и  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T и V. Согласно более предпочтительному варианту осуществления  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из I и V;  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, T, V, W и Y;  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V;  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W;  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y;  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y;  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W;  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из W и Y; и  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

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

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

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

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

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

Фибронектин в естественных условиях связывается с определенными типами интегринов через связывающий интегрин мотив, "аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту" (RGD). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид содержит домен  $^{10}$ Fn3, который не содержит связывающий интегрин мотив (RGD). Связывающий интегрин домен может быть удален путем изменения последовательности

RGD с помощью аминокислотной замены, делеции или вставки. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные последовательности петли BC, DE и/или FG, идентичные подчеркнутой части любой из SEQ ID NO: 7-38, 39-45 и 46-79, соответственно, как показано в табл. 1, переносят в не представляющие собой домены <sup>10</sup>Fn3 белковые каркасные элементы. Например, одна или несколько аминокислотных последовательностей петли обменивается на или вставляется в одну или несколько петель CDR тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента. Согласно другим вариантам осуществления домен белка, в который одна или несколько аминокислотных последовательностей петель обменивается или вставляется, включает в себя без ограничения консенсусные домены Fn3 (Centocor, US), белки с анкириновыми повторами (Molecular Partners AG, Zurich Switzerland), доменные антитела (Domantis, Ltd, Cambridge, MA), однодоменные нанотела верблюда (Ablynx, Belgium), липокаины (например, антикаины; Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), авимеры (Amgen, CA), аффитела (Affibody AG, Sweden), убикитин (например, аффилины; Scil Proteins GmbH, Halle, Germany), миметики эпитопов белков (Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland), каркасные элементы в виде спиральных тяжей (например, альфатела, Complix, Belgium), домены Fyn SH3 (Covagen AG, Switzerland) или атримеры (Anaphor, Inc., CA).

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

Таблица 1

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

|          |                               |    |                          |    |                                 |    |
|----------|-------------------------------|----|--------------------------|----|---------------------------------|----|
| 3006_A10 | <u>SWDAPGGLAR</u>             | 22 | <u>I<sub>GRGST</sub></u> | 43 | <u>TIDRDGVNH<sub>FAP</sub></u>  | 63 |
| 3007_B08 | <u>SWSLPTPLAH</u>             | 23 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTHHGVIGYKP</u>             | 64 |
| 3007_C09 | <u>SWSLPHRGVAN</u>            | 24 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TLTGANV<sub>IIYKP</sub></u>  | 65 |
| 3007_C10 | <u>SWSLPSSGVAH</u>            | 25 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTNTGV<sub>IIYKP</sub></u>  | 66 |
| 3008_A03 | <u>SWSLPHHGFGH</u>            | 26 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTATG<sub>IIYKP</sub></u>   | 67 |
| 3008_B08 | <u>SWSLPHAGDAH</u>            | 27 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTRAGFYRYKP</u>             | 68 |
| 3008_D04 | <u>SWSLPHNGVAH</u>            | 28 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTREEVISYKP</u>             | 69 |
| 3008_F01 | <u>SWSLPRQGLAN</u>            | 29 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTAAGV<sub>IIYKP</sub></u>  | 70 |
| 3008_G01 | <u>SWSLPGPGH<sub>FH</sub></u> | 30 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTANQPI<sub>IIYKP</sub></u> | 71 |
| 3008_G03 | <u>SWSLPHPG<sub>LGH</sub></u> | 31 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TITPETI<sub>IVYKP</sub></u>  | 72 |
| 3115_D04 | <u>SWDAPRGLAR</u>             | 32 | <u>FGRGTT</u>            | 44 | <u>TIDRDGTRS<sub>FDP</sub></u>  | 73 |
| 3115_E06 | <u>SWDAPAGLAR</u>             | 33 | <u>VGRGNT</u>            | 45 | <u>TIFRDGPVTW<sub>D</sub>P</u>  | 74 |
| 3116_A06 | <u>SWSLPHQGKAN</u>            | 34 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTDTGYLKYKP</u>             | 75 |
| 3116_A07 | <u>SWDAPKGLAR</u>             | 35 | <u>VGRGNT</u>            | 45 | <u>TIFRDGPVTW<sub>D</sub>P</u>  | 74 |
| 3116_C01 | <u>SWSLPNPGIAH</u>            | 36 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TLTGSDTIFYKP</u>             | 76 |
| 3116_C06 | <u>SWSLPRPGNAH</u>            | 37 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTGKDV<sub>IKYKP</sub></u>  | 77 |
| 3116_H06 | <u>SWDAPAGLAR</u>             | 33 | <u>VGRGNT</u>            | 45 | <u>TIFRDGVVNYGP</u>             | 78 |
| 3146_A08 | <u>SWSLPNPGNAH</u>            | 38 | <u>PGRGVT</u>            | 39 | <u>TVTDTGFITYKP</u>             | 79 |

SEQ ID NO иллюстративных антимиостатиновых моноклональных антител согласно настоящему изобретению представлены в табл. 2.



Таблица 2

| Антимиостатиновые моноаднектины                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                        | Последовательность                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                                                                                                                                                                        | Аминокислотная последовательность                                                                                                                 | Последовательность нуклеиновой кислоты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 1979_B06 также упоминается в настоящем документе как ATI-1133 (Сердцевинная последовательность 1 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHAGHVNYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSQM<br>IHYPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HHH (SEQ ID NO: 80)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCT<br>GGTCATGTGAACATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACCTCTGACTAAATCTCAGATGATCCA<br>TTACATGCCAATTTCATTAAATTACCGCAC<br>AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC<br>ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 124) |
| 2062_G02 также упоминается в настоящем документе как ATI-1134 (Сердцевинная последовательность 2 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWVSPRGRARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGSTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTIYRDGMS<br>HHDPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 81) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGT<br>CGTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTTCTAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTACCGTGACGGTATGTCTCATCAT<br>GACCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 125)     |
| 2522_C09 (Сердцевинная последовательность 3 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)                                                      | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWEVPRGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVLGRGSTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVYRDGPL<br>LLAPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 82) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGAAGTGCCGCGTGCC<br>CTAGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGCTTGGTCGTGGTTCTAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTGTGTACCGTGACGGGCCGTTGCTTCTT<br>GCCCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 126)     |
| 2523_G06 (Сердцевинная последовательность 4 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)                                                      | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWWAPLGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGSTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTIFRTGMV<br>QYDPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 83) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTGGGCCCCGCTGGGT<br>CTTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGCCTGGTCGGGGCTCTAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTTCCGTACGGGCATGGTTCAATAT<br>GACCCAATTTCCATTAAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 127)     |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2524_C11<br><br>(Сердцевинная последовательность 5 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)  | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGLAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTNSEII<br>LYKPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 84) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGACTCTGCCGATGCT<br>GGTCTTGCGCACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCCTCTGACTAATTCTGAGATTATCCTT<br>TACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC<br>AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC<br>ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 128)      |
| 2524_D09<br><br>(Сердцевинная последовательность 6 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)  | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWYLPYPAHMYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGLTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSQIL<br>HHRPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 85)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT<br>GCGCATATGAACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCAGTGTGCCTGGCGGGGTCT<br>GACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCCTCTGACAAAATCTCAGATTCTCCA<br>TCATAGGCCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 129)   |
| 2524_E10<br><br>(Сердцевинная последовательность 7 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPFAGHLNYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTLTRSKIHH<br>YMPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>H (SEQ ID NO: 86)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCAATGCCGTTTGTG<br>GTCAATTTGAACTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCAGTGTGCCTGGTGGTGGTGT<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTCTGACTCGCTCTAAGATTATTCATTA<br>TATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAG<br>AAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCAC<br>CACCACCAC (SEQ ID NO: 130)  |
| 2524_H05<br><br>(Сердцевинная последовательность 8 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)  | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYSGLANYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTLTHSNIIR<br>YVPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>H (SEQ ID NO: 87) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCTTATTCTG<br>GCCTTGCGAACTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCAGTGTGCCTGGTGGTGGGTT<br>ACAGCTACTATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTCTGACTCACTCTAATATAAATTCGAT<br>ACGTGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA<br>GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA<br>CCACCACCAC (SEQ ID NO: 131) |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2524_H11<br><br>(Сердцевинная последовательность 9 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6)  | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTVSSTKVI<br>VYLPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 88)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCCCTACCGCATGCG<br>GGTCATGCGCACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCTGGAGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACGTGTGTCTAGTACAAAGGTGATAGT<br>TTACCTGCCAATTTCATTAATTACCGCAC<br>AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC<br>ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 132)  |
| 2525_B01<br><br>(Сердцевинная последовательность 10 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLNPFGLINYRITYGETG<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTITKSTIIY<br>KPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH<br>(SEQ ID NO: 89)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGAATTC<br>GGTCTTATTAATTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCTGGTGT<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTATCACCAAATCTACTATCATCATTTA<br>CAAGCCAATTTCATTAATTACCGCACAG<br>AAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCAC<br>CACCACCAC (SEQ ID NO: 133)     |
| 2525_D02<br><br>(Сердцевинная последовательность 11 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGRAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTVTTTSVI<br>LYKPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 90)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCT<br>GGTCGTGCGCACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACGTGTGACGACAACTTCGGTGATCCT<br>TTACAAGCCAATTTCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 134) |
| 2525_D05<br><br>(Сердцевинная последовательность 12 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYAGHLNYYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSQLI<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 91) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTCTTATGCTG<br>GTCATCTAAACTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCTGGTGTG<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACATT<br>ACATGCCAATTTCATTAATTACCGCACA<br>GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA<br>CCACCACCAC (SEQ ID NO: 135)     |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2525_F07<br><br>(Сердцевинная последовательность 13 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYAAHMNYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTRSQVI<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 92) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGTATGCT<br>GCTCACATGAACATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACCTGTGCTGGTCTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTTTGACTAGATCACAGGTGATTCA<br>TTACATGCCAATTTCATTAATTACCGCAC<br>AGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC<br>ACCACCACCAC (SEQ ID NO: 136)   |
| 2987_A06<br><br>(Сердцевинная последовательность 14 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSKII<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 93) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCAACAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 137) |
| 2987_B04<br><br>(Сердцевинная последовательность 15 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTLTKSKIIH<br>YMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>H (SEQ ID NO: 94) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCAACAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGCATGCA<br>GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 138) |
| 2987_B09<br><br>(Сердцевинная последовательность 16 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGRAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTRSKII<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 95) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCAACAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCCGAGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 139)  |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2987_C02<br><br>(Сердцевинная последовательность 17 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPQVDYITITVYAVTLTKSKII<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 96) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGTCTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 140)  |
| 2987_D05<br><br>(Сердцевинная последовательность 18 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPQVDYITITVYAVTLTRSKII<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 97) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGTCTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCCGACGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 141)  |
| 2987_E03<br><br>(Сердцевинная последовательность 19 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVATISGL<br>KPGVDYITITVYAVTLTRSKIII<br>YMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>H (SEQ ID NO: 98) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGATGCA<br>GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGTCTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCCGACGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 142)  |
| 2987_E08<br><br>(Сердцевинная последовательность 20 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGRAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVATISG<br>LKPQVDYITITVYAVTVSSTKVI<br>HYKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 99) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGTCTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCGTTAGCAGCACCAAAAGTGATTCATTA<br>TAAACCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 143) |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2987_F01<br><br>(Сердцевинная последовательность 21 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTRSKII<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 100)   | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCCGACGCAAAATTATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 144)  |
| 2987_F06<br><br>(Сердцевинная последовательность 22 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSKVI<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 101)   | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAAGCAAAGTGATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 145) |
| 2987_G04<br><br>(Сердцевинная последовательность 23 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYPGHLNYYRITYGETG<br>GNNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTLTKSKVI<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 102) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATCCG<br>GGTCATCTGAATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAAGCAAAGTGATTCATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 146) |
| 2987_G09<br><br>(Сердцевинная последовательность 24 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGRAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTVSSTKVI<br>VYLPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 103)   | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCTGCCGTATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCGTTAGCAGCACCAAAAGTTATTGTTTA<br>TCTGCCGATTAGCATTAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 147)  |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2987_H02<br><br>(Сердцевинная последовательность 25 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPYAGHAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTKSKVI<br>HYMPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 104) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGTCACTGCCGTATGCA<br>GGTCATGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTATGCAGTT<br>ACCCTGACCAAAAGCAAAGTGATTCAATTA<br>TATGCCGATTAGCATTAAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 148)  |
| 2987_H07<br><br>(Сердцевинная последовательность 26 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWTLPHAGRAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTVTTTKVI<br>HYKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 105) | ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGGTGTTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCAATTACCGTTATGCAGTT<br>ACCGTTACCAACCACCAAAGTGATTCAATTA<br>TAAACCGATTAGCATTAAATTATCGCACCG<br>AAATTGATAAACCGAGCCAGCATCATCAT<br>CACCATCAT (SEQ ID NO: 149) |
| 3006_A10<br><br>(Сердцевинная последовательность 27 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWDAPGGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVIGRGSTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTIDRDGVN<br>HFAPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 106) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGGTGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCATGTGATCGGTCTGTGTAGCAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCGACCGTGACGGTGTCAACCACTTC<br>GCCCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 150)        |
| 3007_B08<br><br>(Сердцевинная последовательность 28 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWSLPTPLAHYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVTHHGV<br>GYKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 107)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCGACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGACTCCA<br>GGTCTCGCCCATTAATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCATGTGCCTGGTCTGTGGTGTT<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTCACTCATCACGGCGTCATCGGCT<br>ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA<br>GAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCA<br>CCACCACCAC (SEQ ID NO: 151)   |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3007_C09<br><br>(Сердцевинная последовательность 29 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u><br>ISWSLPHRGVANYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTLTGANV<br>IYKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HH (SEQ ID NO: 108)    | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCGT<br>GGTGTCGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACCTCACTGGAGCGAACGTCATCAT<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 152)  |
| 3007_C10<br><br>(Сердцевинная последовательность 30 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u><br>ISWSLPSSGVAHYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVNTGVI<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>H (SEQ ID NO: 109)     | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAGCAGC<br>GGTGTCGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACGTGCTAACTGGTGTATCATCAT<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 153)   |
| 3008_A03<br><br>(Сердцевинная последовательность 31 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u><br>ISWSLPHHGFHYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVTATGIII<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>H (SEQ ID NO: 110)    | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATCAC<br>GGTTTCGGCCATTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTCACTGTACGGGGATCATCATCT<br>ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA<br>GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA<br>CCACCACCAC (SEQ ID NO: 154)   |
| 3008_B08<br><br>(Сердцевинная последовательность 32 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLL</u><br>ISWSLPHAGDAHYYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTVTRAGF<br>YRYKPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HHH (SEQ ID NO: 111) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACGCC<br>GGTGACGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTGTTACTAGAGCGGGTTTCTACCG<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 155) |



|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3008_D04<br><br>(Сердцевинная последовательность 33 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHNGVAHYRITYGET<br>GGNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPVDYITITVYAVTVTREEVI<br>SYKPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 112)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATAAT<br>GGTGTCGCCCATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCAGTGTCACTCGGAGGAAGTCATCAG<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 156)  |
| 3008_F01<br><br>(Сердцевинная последовательность 34 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPRQGLANYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYITITVYAVTVTAAGVII<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH<br>H (SEQ ID NO: 113) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGTCAG<br>GGTCTCGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCAGTGTCACTGCTGCTGGGGTCATCAT<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 157) |
| 3008_G01<br><br>(Сердцевинная последовательность 35 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPGPGHFHYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYITITVYAVTVTANQPII<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH<br>H (SEQ ID NO: 114) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGACCG<br>GGTCACTTCCATTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTCACTGTAAACAGCCCATCATCT<br>ACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCACA<br>GAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA<br>CCACCACCAC (SEQ ID NO: 158)   |
| 3008_G03<br><br>(Сердцевинная последовательность 36 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHPLGHYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYITITVYAVTITPETIIVY<br>KPISINYRTEIDKPSQHNNHHH<br>(SEQ ID NO: 115)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGACCC<br>GGTCTCGGCCATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTATCACTCCGGAACGATCATCGT<br>CTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 159)  |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3115_D04<br><br>(Сердцевинная последовательность 37 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWDAPRGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVFGRGTTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTIDRDGTR<br>SFDPI SIN YRTEIDKPSQHNNHH<br>H (SEQ ID NO: 116) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGTTTCGGTCGTGGTACCAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCGACCGTGACGGTACCCGACGCTTC<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 160)   |
| 3115_E06<br><br>(Сердцевинная последовательность 38 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWDAPAGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVVGRTATISG<br>LKPVDYTITVYAVTIFRDGPV<br>TWDPI SIN YRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 117)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGTTTCGGTCGTGGTAACAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 161)   |
| 3116_A06<br><br>(Сердцевинная последовательность 39 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWSLPHQKGANYRITYGET<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISG<br>LKPVDYTITVYAVTVDGTGY<br>LKYKPISIN YRTEIDKPSQHNNH<br>HHH (SEQ ID NO: 118)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAA<br>GGTAAAGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTGTTACTGATACAGGGTACCTCAA<br>GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 162) |
| 3116_A07<br><br>(Сердцевинная последовательность 40 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWDAPKGLARYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVVGRTATISG<br>LKPVDYTITVYAVTIFRDGPV<br>TWDPI SIN YRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 119)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGTTTCGGTCGTGGTAACAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 163)   |

|                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3116_C01<br><br>(Сердцевинная последовательность 41 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSL<br>ISWSLPNPGIAHYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTLTGSDTIF<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>H (SEQ ID NO: 120) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCC<br>GGTATCGCCCATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACCTCACTGGCAGTGACACCATCTT<br>CTACAAACCAATTTCCATTAAATACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 164)   |
| 3116_C06<br><br>(Сердцевинная последовательность 42 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSL<br>ISWSLPNPGNAHYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVTGKDVI<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNHH<br>HH (SEQ ID NO: 121) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCGGCGG<br>GGTAACGCCCATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACCTGTTACTGGCAAAGATGTCATCAA<br>GTACAAACCAATTTCCATTAAATACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 165) |
| 3116_H06<br><br>(Сердцевинная последовательность 43 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSL<br>ISWDAPAGLARYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVVRGNTATISG<br>LKPVGVDYTITVYAVTIFRDGV<br>VNYGPISINYRTEIDKPSQHNNH<br>HHH (SEQ ID NO: 122) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGTGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACTGTGGTCGGTCGTGGTAACAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGTGTCA<br>CTATCTCCGTGACGGTGTGTCACCTAC<br>GGCCCAATTTCCATTAAATACCGCACAGA<br>AATTGACAAACCATCCCAGCACCATCACC<br>ACCACCAC (SEQ ID NO: 166)        |
| 3146_A08<br><br>(Сердцевинная последовательность 44 аднектина, содержащая концевую последовательность AdNT1 (подчеркнута) и AdCT1 (курсив) с меткой His6) | MGVSDVPRDLEVVAATPTSL<br>ISWSLPNPGNAHYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVPGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTVDTGFIG<br>YKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH<br>H (SEQ ID NO: 123) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCG<br>GGTAACGCCCATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACCTGTTACTGACACAGGTTTCATCAC<br>GTACAAACCAATTTCCATTAAATACCGCA<br>CAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT<br>CACCACCACCAC (SEQ ID NO: 167) |

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

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

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

миостатина/аднектина #2 такой же или выше, чем у одного миостатина, значит, два аднектина связываются независимо друг от друга и их сайты связывания аднектина не перекрываются. Если, однако, сигнал связывания смесей миостатина/аднектина #2 ниже сигнала связывания для одного миостатина, то подтверждается, что связывание аднектина #2 блокирует связывание аднектина #1 с миостатином. Особенности этих экспериментов заключается в использовании насыщающих концентраций аднектина #2. Если миостатин не насыщен аднектином #2, то вышеизложенные выводы не поддерживаются. Подобные эксперименты могут быть использованы для определения того, связываются ли любые два связывающих миостатин белка с перекрытием аднектиновых сайтов связывания.

Оба анализа, примеры которых приведены выше, также могут быть выполнены в обратном порядке, где аднектин #2 иммобилизуют и миостатин-аднектин #1 добавляют к планшету. Альтернативно, аднектин #1 и/или #2 может быть заменен моноклональным антителом и/или растворимым слитым белком рецептор-Fc. Согласно другому варианту осуществления конкуренция может быть определена с использованием сэндвич-анализа HTRF, как описано в примере 4. Согласно другим вариантам осуществления конкурирующий аднектин представляет собой аднектин, который связывается с тем же сайтом связывания аднектина на миостатине, в частности, описанный в настоящем документе антимиостатиновый аднектин. Могут быть использованы стандартные техники картирования, такие как протеазное картирование, мутационный анализ, рентгеновская кристаллография и 2-мерный ядерный магнитный резонанс, чтобы определить, связывается ли аднектин с тем же сайтом связывания аднектина в качестве эталонного аднектина (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

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

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

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

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

## II. Удлиненные последовательности

Согласно некоторым вариантам осуществления молекулы антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, чтобы содержать N-концевую последовательность удлинения и/или C-концевое удлинение. Например, последовательность MG может быть помещена на N-конце <sup>10</sup>Fn3, определенной SEQ ID NO: 4. М, как правило, будут отщеплять, оставляя G на N-конце. Альтернативно, первые 10 аминокислот антимиостатиновых аднектинов, показанных в табл. 2, могут быть заменены на альтернативную N-концевую последовательность, называемую в настоящем документе как N-концевые удлинения, как показано в табл. 7. Кроме того, М, G или MG могут также быть помещены N-терминально по отношению к любому из N-концевых удлинений, представленных в табл. 7. Описанные в настоящем документе антимиостатиновые аднектины могут также содержать альтернативные C-концевые хвостовые последовательности, называемые в настоящем документе C-концевыми последовательностями удлинения. Например, антимиостатиновые аднектиновые последовательности, представленные в табл. 2, могут быть усечены по треонину, соответствующему T94 из SEQ ID NO: 4 (т.е. усеченная после INYRT (SEQ ID NO: 168) часть последовательности). Такой усеченный вариант может быть использован в качестве терапевтических молекул в усеченной форме, или альтернативные C-концевые удлинения могут быть добавлены после остатка треонина. Иллюстративные C-концевые последовательности удлинения показаны в табл. 7. Иллюстративные антимиостатиновые аднектины, содержащие C-концевые последовательности удлинения, показаны в табл. 2, как SEQ ID NO: 80-123. Например, SEQ ID NO: 80 (клон 1979\_B06) содержит встречающееся в природе C-концевое удлинение EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) с последующим тегом His6 (SEQ ID NO: 328). Тем не менее, следует понимать, что метка His6 не представляет собой обязательную.

Согласно некоторым вариантам осуществления С-концевые последовательности удлинения (также называемые "хвосты"), содержат остатки Е и D, и могут составлять от 8 до 50, от 10 до 30, от 10 до 20, от 5 до 10 и от 2 до 4 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления хвостовые последовательности включают в себя основанные на ED линкеры, в которых последовательность содержит tandemные повторы ED. В иллюстративных вариантах осуществления хвостовая последовательность содержит от 2 до 10, от 2 до 7, от 2 до 5, от 3 до 10, от 3 до 7, от 3 до 5, 3, 4 или 5 повторов ED. Согласно некоторым вариантам осуществления основанные на ED хвостовые последовательности могут также включать в себя дополнительные аминокислотные остатки, такие как, например: EI, EID, ES, EC, EGS и EGC. Такие последовательности основаны, в частности, на известных хвостовых последовательностях аднектина, таких как EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211), в которых остатки D и K были удалены. Согласно иллюстративным вариантам осуществления основанный на ED хвост содержит остатки E, I или EI перед повторами ED. Согласно другим вариантам осуществления N- или С-концевые последовательности могут быть объединены с известными линкерными последовательностями (например, SEQ ID NO: 181-227 в табл. 4), что необходимо при разработке слитой молекулы антимиостатинового аднектина. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности могут быть размещены на С-конце домена  $^{10}\text{Fn3}$ , чтобы облегчить прикрепление фармакокинетического фрагмента. Например, цистеин, содержащий линкер, такой как GSGC (SEQ ID NO: 189), может быть добавлен к С-концу для облегчения сайт-направленного пегилирования на остатке цистеина. Иллюстративные антимиостатиновые аднектины, содержащие цистеин-содержащий линкер, показаны в табл. 5 в SEQ ID NO: 228-239.

### III. Фармакокинетические фрагменты

Согласно одному аспекту в настоящей заявке предусмотрены антимиостатиновые аднектины, дополнительно содержащие фармакокинетический (РК) фрагмент. Улучшенная фармакокинетика может быть оценена в соответствии с предполагаемой терапевтической необходимостью. Часто желательно увеличить биодоступность и/или увеличить время между дозами, возможно, за счет увеличения времени, в течение которого белок остается доступным в сыворотке после введения дозы. В некоторых случаях желательно улучшить постоянство концентрации сывороточного белка с течением времени (например, уменьшить разницу в сывороточной концентрации белка вскоре после введения и незадолго до следующего введения). Антимиостатиновый аднектин может быть присоединен к фрагменту, который уменьшает скорость выведения полипептида у млекопитающего (например, мыши, крысы или человека) более чем в два раза, более чем в три раза, более чем в четыре раза или более чем в пять раз, по сравнению с немодифицированным антимиостатиновым аднектином. Другие меры улучшенной фармакокинетики могут включать в себя время полужизни в сыворотке, которое часто делится на фазу альфа и фазу бета. Одна или обе фазы могут быть значительно улучшены путем добавления соответствующего фрагмента. Например, РК фрагмент может увеличить время полужизни в сыворотке полипептида более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% или более по отношению только к домену Fn3.

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

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

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

Полиэтиленгликоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ представляет собой хорошо известный водорастворимый полимер, который

представляет собой коммерчески доступный или может быть получен путем полимеризации с раскрытием кольца этиленгликоля в соответствии со способами, хорошо известными в настоящей области техники (Sandler and Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Термин "ПЭГ" используется в широком смысле, чтобы охватить любую молекулу полиэтиленгликоля, безотносительно к размеру или к модификации на конце ПЭГ, и может быть представлен следующей формулой:  $\text{X-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , где  $n$  составляет от 20 до 2300 и  $\text{X}$  представляет собой  $\text{H}$  или конечную модификацию, например,  $\text{C}_{1-4}$ алкил. ПЭГ может содержать дополнительные химические группы, которые необходимы для реакций связывания, которые представляют собой результат химического синтеза молекулы или которые действуют как спейсеры для оптимального расстояния частей молекулы. Кроме того, такой ПЭГ может состоять из одной или нескольких боковых цепей ПЭГ, которые связаны друг с другом. ПЭГ с более чем одной цепью ПЭГ называются многоплечими или разветвленными ПЭГ. Разветвленные ПЭГ описаны, например, в Европейской опубликованной заявке № 473084А и в патенте США № 5932462.

Одна или несколько молекул ПЭГ могут быть присоединены в различных положениях к белку, и такое присоединение может быть осуществлено путем реакции с аминами, тиолами или других подходящими реакционноспособными группами. Фрагмент амина может представлять собой, например, первичный амин, найденный на N-конце полипептида, или аминную группу, присутствующую в аминокислоте, такую как лизин или аргинин. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент ПЭГ присоединяют в положении на полипептиде, выбранном из группы, состоящей из: а) N-конца; б) между N-концом и наиболее N-терминальной бета-цепью или подобной бета-цепью; в) петли, расположенной на лицевой стороне полипептида напротив сайта связывания-мишени; d) между C-концом и наиболее C-концевой бета-цепью или подобной бета-цепью и e) на C-конце.

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

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

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

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

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

Иллюстративные ПЭГ-модифицированные антимиостатиновые аднектины приведены в табл. 5.

Домен Fc иммуноглобулина (и фрагменты).

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин сливают с Fc-доменом иммуноглобулина или его фрагментом или вариантом. Используемый в настоящем документе термин "функциональная область Fc" представляет собой домен Fc или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с FcRn. Согласно некоторым вариантам осуществления функциональная область Fc связывается с FcRn, но не обладает эффекторной функцией. Способность области Fc или ее фрагмента связываться с FcRn может быть определена с помощью стандартных анализов связывания, известных в настоящей области техники. Согласно другим вариантам осуществления область Fc или ее фрагмент связывается с FcRn и обладает по меньшей мере одной "эффекторной функцией" нативной области Fc. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют комбинации области Fc со связывающим доменом (например, антимиостатиновым аднектином) и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в настоящей области техники для оценки таких эффекторных функций антитела. "Нативная последовательность области Fc" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. "Вариантная область Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области Fc по меньшей мере одной модификацией аминокислоты. Предпочтительно, вариантная область Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, а предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. Вариантная область Fc в настоящем документе будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности с нативной последовательностью области Fc или области Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с ними, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности с ними.

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

DKTHTCPPCPAPELLGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (SEQ ID NO: 169)

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

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

QPDEPGGSG (SEQ ID NO: 208) и TVAAPSG (SEQ ID NO: 209) Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc, используемая в слиянии антимиостатинового аднектина, содержит шарнирную область молекулы Fc. Используемая в настоящем документе "шарнирная" область содержит сердцевинные шарнирные остатки, охватывающие положения 1-16 из SEQ ID NO: 169 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 170) области Fc IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления слияние антимиостатиновый аднектин-Fc принимает многомерную структуру (например, димер) из-за, в частности, остатков цистеина в положениях 6 и 9 SEQ ID NO: 169 внутри шарнирной области. Согласно другим вариантам осуществления используемая в настоящем документе шарнирная область может дополнительно включать в себя остатки, полученные из областей CH1 и CH2, которые фланкируют последовательность сердцевинной петли, как показано в SEQ ID NO: 169. Согласно еще другим вариантам осуществления шарнирная последовательность представляет собой GSTHTCPPCPAPELLG (т.е. шарнирная последовательность для PRD-932; SEQ ID NO: 180).

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
176)

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

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

**GVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWTLPHAGRAHYIRITYGETGGNSPVQEFVTPGRGVTAT**  
**ISGLKPGVDYITIVYAVVTTTKVIHYKPIINRYTEIEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSV**  
**FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**  
**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL**  
**PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS**  
**DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (PRD-1171; SEQ ID NO:**  
**253).**

Лидерная последовательность выделена жирным шрифтом, последовательность антимиостатинового аднектина - курсивом и шарнирная область подчеркнута. Следует понимать, что С-концевой лизин



представляет собой необязательный. В настоящем документе область Fc содержит области CH2 и CH3 IgG1 человека следующим образом:

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 178)

и шарнирная последовательность DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170). Следующая последовательность представляет собой пример конструктора Fc-антимиостатинового аднектина:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
ELQLEESAEEAQEGEGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWLSLPHQGKANYRITYGETG  
GNSPVQEFVTPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTDGTLKYKPIISINRYTEI (PRD-  
1474; SEQ ID NO: 273).

Шарнирная область подчеркнута, лидерная последовательность выделена жирным шрифтом, а последовательность антимиостатинового аднектина - курсивом.

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

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 179)

и шарнирная последовательность DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 170). Иллюстративные слияния антимиостатинового аднектина-Fc и слияния Fc-антимиостатинового аднектина приведены в табл. 6 (SEQ ID NO: 252-273). Все последовательности могут начинаться с метионина или лидерной последовательности млекопитающего (например, SEQ ID NO: 177).

#### Аднектины.

Согласно некоторым вариантам осуществления ПК фрагмент представляет собой другой аднектин, специфический, например, к сывороточному белку (например, человеческому сывороточному альбумину), как описано в US 2012/0094909, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Другие ПК фрагменты, которые могут быть использованы с аднектинами согласно настоящему изобретению, описаны в Kontermann et al. (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22:868-76), как обсуждалось выше. В качестве примера, такие основанные на аднектине ПК фрагменты могут быть прямо или косвенно связаны с антимиостатиновым аднектином посредством полипептидного линкера. Подходящие линкеры для присоединения доменов Fn3 представляют собой те, которые позволяют отдельные домены складывать независимо друг от друга и образовывать трехмерную структуру, которая позволяет высоко-аффинное связывание с молекулой-мишенью. Иллюстративные полипептидные линкеры включают в себя PSTSTST (SEQ ID NO: 210), EIDKPSQ (SEQ ID NO: 211) и GS линкеры, такие как GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 213) и их мультимеры. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. Эти линкеры содержат остатки глицина и серина и могут составлять в пределах от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот в длину. Примеры включают в себя линкеры, содержащие аминокислотную последовательность (GS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 215), G(GS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 216) и G(GS)<sub>7</sub>-G (SEQ ID NO: 217). Другие линкеры содержат глутаминовую кислоту и включают в себя, например, (GSE)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 218) и GGSEGGSE (SEQ ID NO: 219). Другие иллюстративные глицин-сериновые линкеры включают в себя (GS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 212), (GGGS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 220), (GGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 221) и (GGGS)<sub>3</sub>-G (SEQ ID NO: 222). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-пролина. Эти линкеры содержат глициновые и пролиновые остатки и могут составлять от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 аминокислот в длину. Примеры включают в себя линкеры, содержащие аминокислотную последовательность (GP)<sub>3</sub>-G (SEQ ID NO: 223), (GP)<sub>5</sub>-G (SEQ ID NO: 224) и GPG. Согласно другим вариантам осуществления линкер может представлять собой основанный на пролине-аланине линкер, состоящий от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 аминокислот в длину. Примеры линкеров на основе пролина и аланина включают в себя, например, (PA)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 225), (PA)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 226) и (PA)<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 227). Оптимальная длина линкера и аминокислотная композиция может быть определена с помощью обычных экспериментов в рассмотрении представленных в настоящем документе учений. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин связан, например, с аднектином к HSA посредством полипептидного линкера, содержащего сайт протеазы, который расщепляется с помощью протеазы в крови или ткани-мишени.

Такие варианты осуществления могут быть использованы для высвобождения антимиостатинового аднектина для лучшей доставки или терапевтических свойств, или более эффективного производства.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин может быть прямо или косвенно связан, например, с аднектином к HSA с помощью полимерного линкера. Полимерные линкеры могут быть использованы для оптимального изменения расстояния между каждым компонентом слияния для создания белкового слияния с одной или несколькими из следующих характеристик: 1) уменьшенным или увеличенным пространственным затруднением связывания одного или нескольких доменов белка при связывании с представляющим интерес белком, 2) повышенной стабильностью или растворимостью белка, 3) уменьшенной агрегацией белка и 4) увеличенной общей авидностью или аффинностью белка. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновый аднектин связан, например, с аднектином к HSA с помощью биосовместимого полимера, такого как полимерный сахар. Полимерный сахар может включать в себя ферментативный сайт расщепления, который расщепляется с помощью фермента в крови или ткани-мишени. Такие варианты осуществления могут быть использованы для высвобождения антимиостатинового аднектина для лучшей доставки или терапевтических свойств или более эффективного производства.

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

Таблица 3

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

|                                |                                                                            |  |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------|
| 83)                            |                                                                            |  |                                  |
| 2524_C11<br>(SEQ ID NO:<br>84) |                                                                            |  |                                  |
| 2524_D09<br>(SEQ ID NO:<br>85) | ATI-1275 (SEQ ID NO: 231) [NEM];<br>ATI-1276 (SEQ ID NO: 231) [40k 2 бет.] |  |                                  |
| 2524_E10<br>(SEQ ID NO:<br>86) |                                                                            |  |                                  |
| 2524_H05<br>(SEQ ID NO:<br>87) |                                                                            |  |                                  |
| 2524_H11<br>(SEQ ID NO:<br>88) |                                                                            |  |                                  |
| 2525_B01<br>(SEQ ID NO:<br>89) |                                                                            |  |                                  |
| 2525_D02<br>(SEQ ID NO:<br>90) | ATI-1267 (SEQ ID NO: 230) [NEM];<br>ATI-1266 (SEQ ID NO: 230) [40k 2 бет.] |  |                                  |
| 2525_D05<br>(SEQ ID NO:<br>91) | ATI-1277 (SEQ ID NO: 232) [NEM];<br>ATI-1278 (SEQ ID NO: 232) [40k 2 бет.] |  | PRD-932 [L1]<br>(SEQ ID NO: 252) |
| 2525_F07<br>(SEQ ID NO:<br>92) |                                                                            |  |                                  |
| 2987_A06<br>(SEQ ID NO:<br>93) |                                                                            |  |                                  |
| 2987_B04<br>(SEQ ID NO:<br>94) |                                                                            |  |                                  |
| 2987_B09<br>(SEQ ID NO:<br>95) |                                                                            |  |                                  |

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

|                                 |                                        |                                  |                                                                       |
|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 3006_A10<br>(SEQ ID NO:<br>106) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3007_B08<br>(SEQ ID NO:<br>107) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3007_C09<br>(SEQ ID NO:<br>108) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3007_C10<br>(SEQ ID NO:<br>109) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_A03<br>(SEQ ID NO:<br>110) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_B08<br>(SEQ ID NO:<br>111) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_D04<br>(SEQ ID NO:<br>112) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_F01<br>(SEQ ID NO:<br>113) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_G01<br>(SEQ ID NO:<br>114) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3008_G03<br>(SEQ ID NO:<br>115) |                                        |                                  |                                                                       |
| 3115_D04<br>(SEQ ID NO:<br>116) | ATI-1375 (SEQ ID NO: 235) [40k 2 бет.] | PRD-1301[L2]<br>(SEQ ID NO: 265) | PRD-1284[L5]<br>(SEQ ID NO: 260)                                      |
| 3115_E06<br>(SEQ ID NO:<br>117) | ATI-1376 (SEQ ID NO: 236) [40k 2 бет.] | PRD-1302[L2]<br>(SEQ ID NO: 266) | PRD-1285[L5]<br>(SEQ ID NO: 261);<br>PRD-1472[L8]<br>(SEQ ID NO: 271) |

|                                 |                                                                            |                                  |                                                                       |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 3116_A06<br>(SEQ ID NO:<br>118) | ATI-1379 (SEQ ID NO: 239) [40k 2 вет.];<br>ATI-1523 (SEQ ID NO: 239) [NEM] | PRD-1305[L2]<br>(SEQ ID NO: 269) | PRD-1288[L5]<br>(SEQ ID NO: 264);<br>PRD-1474[L8]<br>(SEQ ID NO: 273) |
| 3116_A07<br>(SEQ ID NO:<br>119) | ATI-1377 (SEQ ID NO: 237) [40k 2 вет.]                                     | PRD-1303[L2]<br>(SEQ ID NO: 267) | PRD-1286[L5]<br>(SEQ ID NO: 262);<br>PRD-1473[L8]<br>(SEQ ID NO: 272) |
| 3116_C01<br>(SEQ ID NO:<br>120) |                                                                            |                                  |                                                                       |
| 3116_C06<br>(SEQ ID NO:<br>121) |                                                                            |                                  |                                                                       |
| 3116_H06<br>(SEQ ID NO:<br>122) |                                                                            |                                  |                                                                       |
| 3146_A08<br>(SEQ ID NO:<br>123) | ATI-1378 (SEQ ID NO: 238) [40k 2 вет.]                                     | PRD-1304[L2]<br>(SEQ ID NO: 268) | PRD-1287[L5]<br>(SEQ ID NO: 263)                                      |

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

<sup>b</sup> Аднектины с цистеиновыми мутантами содержат сердцевинную аднектиновую последовательность моноаднектина в первом столбце и предшествующую N-концевую последовательность удлинения (MGVSDVPRDL; SEQ ID NO: 306) и последующий C-концевой хвост (GSGC[модификация]HNNHHH; SEQ ID NO: 326 или EGSGC[Модификация]HNNHHH; SEQ ID NO: 327), как показано в табл. 5.

<sup>c</sup> Аднектины с Fc фрагментом на C-конце содержат сердцевинную аднектиновую последовательность моноаднектина в первом столбце с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) и последующим C-концевым хвостом (EI), за которым следует линкерная последовательность (табл. 4) и последовательность Fc области, как описано в табл. 6.

<sup>d</sup> Аднектины с Fc фрагментом на N-конце содержат последовательности области Fc с предшествующей N-концевой шарнирной последовательностью и последующим линкером (табл. 4) и сердцевинной аднектиновой последовательностью моноаднектина в первом столбце с предшествующей N-концевой последовательностью удлинения (GVSDVPRDL; SEQ ID NO: 307) и последующим C-концевым хвостом (EI), как показано в табл. 6.

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

Таблица 4

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

|     |     |                                |
|-----|-----|--------------------------------|
| 201 | L22 | KGSGSGSGSGSGSG                 |
| 202 | L23 | KQPDEPGGSG                     |
| 203 | L24 | KELQLEESAAEAQDGELDG            |
| 204 | L25 | KTVAAPSG                       |
| 205 | L26 | AGGGGSGG                       |
| 206 | L27 | AGGGGSG                        |
| 207 | L28 | GSGSGSGSGSGSG                  |
| 208 | L29 | QPDEPGGSG                      |
| 209 | L30 | TVAAPSG                        |
| 210 | L31 | PSTSTST                        |
| 211 | L32 | EIDKPSQ                        |
| 212 | L33 | GSGSGSGS                       |
| 213 | L34 | GSGSGSGSGS                     |
| 214 | L35 | GSGSGSGSGSGS                   |
| 215 | L36 | GSGSGSGSGSGSGS                 |
| 216 | L37 | GGSGSGSGSGSGS                  |
| 217 | L38 | GGSGSGSGSGSGSGSG               |
| 218 | L39 | GSEGSEGESEGESE                 |
| 219 | L40 | GGSEGGSE                       |
| 220 | L41 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| 221 | L42 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS     |
| 222 | L43 | GGGGSGGGGSGGGGSGG              |
| 223 | L44 | GPGPGPG                        |
| 224 | L45 | GPGPGPGPGPG                    |
| --- | L46 | GPG                            |
| 225 | L47 | PAPAPA                         |
| 226 | L48 | PAPAPAPAPAPA                   |
| 227 | L49 | PAPAPAPAPAPAPAPAPA             |

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



Таблица 5

| Пегилированные антимиостатиновые аднектины                               |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Последовательность                                                       |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Клон                                                                     | Аминокислотная последовательность                                                                                                                             | Последовательность нуклеиновой кислоты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| АТИ-1106 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]                                  | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WVSPRGRARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVPGRGSTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIYRDGMSHNDPISI<br>NYRTGSGC[модификация]HHHH<br>HH (SEQ ID NO: 228)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGTTTCTCCGCGTGGT<br>CGTGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCACCTGTGCCTGGTCGTGGTTCTAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTACCGTGACGGTATGTCTCATCAT<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGG<br>TAGCGGTTGCCACCATCACCACCATCAC<br>(SEQ ID NO: 240)        |
| АТИ-1107 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]                                  | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WSLPHAGHVNYYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTLTKSQMIHYMPI<br>SINYRTGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 229) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCATGCT<br>GGTCATGTGAATATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACCTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTCTGACTAAATCTCAGATGATCCA<br>TTACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCAC<br>AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC<br>AC (SEQ ID NO: 241)     |
| АТИ-1266 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]<br>АТИ-1267 [N-<br>этилмалеймид] | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WTLPHAGRAHYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTVTTTSVILYKPIS<br>INYTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 230)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGACTTTGCCGCATGCT<br>GGTCGTGCGCACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACCTGTGCCTGGGCGGGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTGTGACGACAACTTCGGTGATCCT<br>TTACAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC<br>CATCAC (SEQ ID NO: 242) |

|                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АТИ-1275 [N-этилмалесимид]<br>АТИ-1276 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]                                                                                                      | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WYLPYAHMNYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGLTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTLTKSQLHHRPIS<br>INYRTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 231)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTACCTCCCGTATCCT<br>GCGCATATGAACTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGGCGGGGTCT<br>GACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCCTCTGACAAAATCTCAGATTCTCCA<br>TCATAGGCCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC<br>CATCAC (SEQ ID NO: 243)  |
| АТИ-1277 [N-этилмалесимид]<br>АТИ-1278 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]                                                                                                      | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WSLPYAGHLNYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTLTKSQLIHYMPI<br>SINYRTEGSGC[модификация]HH<br>HHH (SEQ ID NO: 232) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTCCTTATGCTG<br>GTCATCTAACTATTACCGCATCACTTAC<br>GGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGTG<br>ACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGG<br>CGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTCTGACTAAGTCTCAGCTGATACATT<br>ACATGCCAATTTCCATTAATTACCGCACA<br>GAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCA<br>TCAC (SEQ ID NO: 244)   |
| АТИ-1310 [свободный Сус]<br>АТИ-1338 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]<br>АТИ-1339 [40К<br>ПЭГ с 4-мя<br>ветвями]<br>АТИ-1340 [N-этилмалесимид]<br>АТИ-1341 [20К бис-<br>ПЭГ] | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WTLPHAGRAHYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPI<br>SINYRTEGSGC[модификация]HH<br>HHH (SEQ ID NO: 233) | ATGGGTGTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGGTGTGTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCGTTACCACCACCAAAGTGATTCAATTA<br>TAAACCGATTTCATTAATTACCGCACAG<br>AAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCAT<br>CAC (SEQ ID NO: 245) |
| АТИ-1359 [40К<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями]                                                                                                                                    | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WTLPHAGRAHYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPI<br>SINYRTEGSGC[модификация]HH<br>HHH (SEQ ID NO: 234) | ATGGGTGTAGTGATGTTCCGCGTGATCT<br>GGAAGTTGTTGCAGCAACCCGACCAGCC<br>TGCTGATTAGCTGGACCCTGCCGCATGCA<br>GGTCGTGCACATTATTATCGTATTACCTAT<br>GGTGAAACCGGTGGTAATAGTCCGGTTCA<br>GGAATTCACCGTTCCGGGTCTGGTGTGTA<br>CCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT<br>GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTT<br>ACCGTTACCACCACCAAAGTGATTCAATTA<br>TAAACCGATTTCATTAATTACCGAACAG<br>AAGGTAGCGGTTGC (SEQ ID NO: 246)                       |

|                               |              |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АТИ-1375<br>ПЭГ с<br>ветвями] | [40К<br>2-мя | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WDAPRGLARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVFRGTTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIDRDGTRSFDPISI<br>NYRTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 235)  | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAGAGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCCTGTGTTCGGTCTGGTACCAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCGACCGTGACGGTACCCGCAGCTTC<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC<br>AC (SEQ ID NO: 247)   |
| АТИ-1376<br>ПЭГ с<br>ветвями] | [40К<br>2-мя | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WDAPAGLARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVVGRGNTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISI<br>NYRTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 236) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGGCTGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCCTGTGGTTCGGTCTGGTAACAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC<br>AC (SEQ ID NO: 248)   |
| АТИ-1377<br>ПЭГ с<br>ветвями] | [40К<br>2-мя | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WDAPKGLARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVVGRGNTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIFRDGPVTWDPISI<br>NYRTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 237) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGT<br>CTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGG<br>CGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAG<br>GAGTTCCTGTGGTTCGGTCTGGTAACAC<br>AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCG<br>TTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCA<br>CTATCTCCGTGACGGTCCCGTCACCTGG<br>GACCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGA<br>AGGTAGCGGTTGCCACCATCACCACCATC<br>AC (SEQ ID NO: 249)   |
| АТИ-1378<br>ПЭГ с<br>ветвями] | [40К<br>2-мя | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WSLPNPGNAHYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTVTDTFITYKPIS<br>INRTEGSGC[модификация]HHH<br>HHH (SEQ ID NO: 238)   | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGAATCCG<br>GGTAACGCCCATTATTACCGCATCACTTA<br>CGCGGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTGTACTGACACAGGTTTCATCAC<br>GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC<br>CATCAC (SEQ ID NO: 250) |

|                                    |                              |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АТИ-1379<br>ПЭГ с 2-мя<br>ветвями] | [40K<br>[N-<br>этилмалеимид] | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLIS<br>WSLPHQGKANYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPGRGVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTVTDTGYLKYPKPI<br>SINYRTEGSGC[модификация]HH<br>HHHH (SEQ ID NO: 239) | ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCT<br>GGAAGTGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCC<br>TGCTGATCAGCTGGTCTCTGCCGCACCAA<br>GGTAAAGCCAATTATTACCGCATCACTTA<br>CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTGT<br>TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTG<br>GCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCT<br>GTCACTGTACTGATACAGGTACCTCAA<br>GTACAAACCAATTTCCATTAATTACCGCA<br>CAGAAGGTAGCGGTTGCCACCATCACCAC<br>CATCAC (SEQ ID NO: 251) |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

SEQ ID NO иллюстративных Fc-слитых антимистатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению представлены в табл. 6.

Таблица 6

| Fc-слитые антимистатиновые аднектины |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                            |                              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Последовательность                   |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                            |                              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Клон                                 | Аминокислотная последовательность                                                                                                                                                                           | N-концевой домен                                                                                                                                                                           | Линкер                       | C-концевой домен                                                                                                                               | Последовательность нуклеиновой кислоты                                                                                                                                                                                                                                   |
| PRD-932                              | EPKSSGSTHTCPP<br>CPAPELLGGSSV<br>FLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNA<br>KTKPREEQYNST<br>YRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLVK | EPKSSGSTHTC<br>PPCPAPELLGG<br>SSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTY<br>RVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYK<br>CKVSNKALPAP<br>IEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPP | GAGGGGSG<br>(SEQ ID NO: 181) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWSL<br>PYAGHLNYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYITV<br>YAVTLTKSQLIH<br>YMPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 282) | GAGCCCAAATCTAGCGG<br>GTCGACTCACATGCC<br>ACCGTGCCAGCACCTG<br>AACTCCTGGGGGAAGC<br>TCAGTCTTCTCTCCCC<br>CCAAAACCAAGGACAC<br>CCTCATGATCTCCCGAC<br>CCCTGAGGTCACATGCGT<br>GGTGGTGACGTGAGCC<br>ACGAAGACCCTGAGGTC<br>AAGTTCAACTGGTACGTG<br>GACGGCGTGGAGGTGCA<br>TAATGCCAAGACAAAGC |

|                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                    |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTT<br>PPVLDSGGSFFL<br>YSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQK<br>SLSLSPGAGGGG<br>SGGVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLIS<br>WSLPYAGHLNY<br>YRITYGETGGNS<br>PVQEFTVPGRGV<br>TATISGLKPGVD<br>YTITVYAVLTK<br>SQLIHYMPISINY<br>RTEI (SEQ ID<br>NO: 252) | SRDELTKNQVS<br>LTCLVKGFYPS<br>DIAVEWESNG<br>QPENNYKTPP<br>VLDSGGSFFLY<br>SKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYT<br>QKSLSLSP<br>(SEQ ID NO:<br>274) |  |  | CGCGGGAGGAGCAGTAC<br>AACAGCACGTACCGTGT<br>GGTCAGCGTCCTCACCGT<br>CCTGCACCAGGACTGGCT<br>GAATGGCAAGGAGTACA<br>AGTGCAAGGTCTCCAAC<br>AAAGCCCTCCCAGCCCC<br>ATCGAGAAAACCATCTC<br>CAAAGCCAAAGGGCAGC<br>CCCGAGAACCACAGGTG<br>TACACCTGCCCCATCC<br>CGGGATGAGCTGACCAA<br>GAACCAGGTCAGCCTGA<br>CCTGCCTGGTCAAAGGCT<br>TCTATCCCAGCGACATCG<br>CCGTGGAGTGGGAGAGC<br>AATGGGCAGCCGGAGAA<br>CAACTACAAGACCACGC<br>CTCCCGTGCTGGAATCCG<br>ACGGCTCCTTCTCTCT<br>ACAGCAAGCTCACCGTG<br>GACAAGAGCAGGTGGCA<br>GCAGGGGAACGTCTTCTC<br>ATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTA<br>CACGCAGAAGAGCCTCT<br>CCCTGTCTCCCGGCGCCG<br>GAGGCGGCGGATCCGGT<br>GGAGTTTCTGATGTGCCG<br>CGCGACCTGGAAGTGGT<br>TGCTGCCACCCCAACCAG<br>CCTGCTGATCAGCTGGTC<br>TCTTCCTTATGCTGGTCA<br>TCTAACTATTACCGCAT<br>CACTTACGGCGAAACAG<br>GAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCAGTGCCT<br>GGTCGTGGTGTGACAGCT<br>ACCATCAGCGGCCTTAA |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTCTGACTAAGTCTCA<br>GCTGATACATTACATGCC<br>AATTTCCATTAATTACCG<br>GACCGAAATC (SEQ ID<br>NO: 284)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| PRD<br>-<br>1171 | GVSDVPRDLEVV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTTTKVIH<br>YKPISINYRTEIEP<br>KSSDKTHTCPPC<br>PAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWY<br>VDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTK<br>NQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTPP<br>VLDSGDSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLS<br>LSPGK (SEQ ID<br>NO: 253) | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWTLPHAGRA<br>HYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVP<br>GRGVATISGL<br>KPGVDYTITVY<br>AVTVTTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>275) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSGDSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAAGTGG<br>TGGCTGTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCTCCTGGA<br>CACTGCCTCACGCTGGCC<br>GGGCTCATTACTATAGAA<br>TTACCTACGGGGAGACA<br>GGCGGAACTCTCCCGT<br>GCAGGAATTCACCGTGC<br>CTGGAAGGGGCGTGACT<br>GCCACCATCAGTGGGCT<br>GAAGCCAGGAGTGACT<br>ACACAATTACCGTGACTG<br>CTGTGACTGTGACCACAA<br>CTAAAGTGATCCACTACA<br>AACCCTCTCTATTAATT<br>ATCGGACCGAAATTGAG<br>CCTAAGAGCTCCGACAA<br>AACCACACATGCCAC<br>CTTGTCAGCCCCGAAC<br>TGCTGGGCGGCCCTTCAG<br>TCTTCTCTTCCCCCAA<br>AACCAAGGACACCCTC<br>ATGATCTCCCGGACCCT<br>GAGGTCACATGCGTGGT<br>GGTGACGTGAGCCACG<br>AAGACCCTGAGGTCAAG<br>TTCAACTGGTACGTGGAC<br>GGCGTGGAGGTGCATAA<br>TGCCAAGACAAAGCCGC<br>GGGAGGAGCAGTACAAC |

|                  |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                           |   |                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                           |   |                                                                                                                                                                                  | AGCACGTACCGTGTGGTC<br>AGCGTCCTCACCCTCTG<br>CACCAGGACTGGCTGAA<br>TGGCAAGGAGTACAAGT<br>GCAAGGTCTCCAACAAA<br>GCCCTCCCAGCCCCATC<br>GAGAAAACCATCTCCAA<br>AGCCAAAGGGCAGCCCC<br>GAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCTGCCCCCATCCCGG<br>GATGAGCTGACCAAGAA<br>CCAGGTCAGCTGACCTG<br>CCTGGTCAAAGGCTTCTA<br>TCCCAGCGACATCGCCGT<br>GGAGTGGGAGAGCAATG<br>GGCAGCCGGAGAACAA<br>TACAAGACCACGCCTCCC<br>GTGTTGGACTCCGACGGC<br>TCCTTCTCCTCTACAGC<br>AAGCTCACCCTGGACAA<br>GAGCAGGTGGCAGCAGG<br>GGAACGTCTTCTCATGCT<br>CCGTGATGCATGAGGCTC<br>TGCAACAACCTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTG<br>TCTCCCGGAAA (SEQ ID<br>NO: 285) |
| PRD<br>-<br>1173 | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEID<br>KTHTCPPCPAPE<br>LLGGPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPE | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWTLPHAGRA<br>IIYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVP<br>GRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVY<br>AVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>275) | D | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSIIEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAGTGG<br>TGGCTGCTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCTCCTGGA<br>CACTGCCTCACGCTGGCC<br>GGGCTCATTACTATAGAA<br>TTACCTACGGGGAGACA<br>GGCGGGAACCTCTCCCGT<br>GCAGGAATTCACCGTGC<br>CTGGAAGGGCGGTGACT<br>GCCACCATCAGTGGGCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |  |                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQGN<br>VFSCVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>GK (SEQ ID NO:<br>254) |  |  | ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | GAAGCCAGGAGTGGACT<br>ACACAATTACCGTGACG<br>CTGTGACTGTGACCACAA<br>CTAAAGTGATCCACTACA<br>AACCCATCTCTATTAATT<br>ATCGGACCGAAATTGAC<br>AAGACCCACACATGCC<br>ACCTTGTCAGCCCCCGA<br>GCTGCTGGGCGGCCCTTC<br>AGTCTTCTCTTCCCCC<br>AAAACCCAAGGACACCC<br>TCATGATCTCCCGACCC<br>CTGAGGTACATGCGTG<br>GTGGTGGACGTGAGCCA<br>CGAAGACCCTGAGGTCA<br>AGTTCAACTGGTACGTGG<br>ACGGCGTGGAGGTGCAT<br>AATGCCAAGACAAAGCC<br>GCGGGAGGAGCAGTACA<br>ACAGCACGTACCGTGTG<br>GTCAGCGTCCTCACCCTC<br>CTGCACCAGGACTGGCT<br>GAATGGCAAGGAGTACA<br>AGTGCAAGGTCTCCAAC<br>AAAGCCCTCCCAGCCCC<br>ATCGAGAAAACCATCTC<br>CAAAGCCAAAGGGCAGC<br>CCCGAGAACCACAGGTG<br>TACACCCTGCCCCATCC<br>CGGGATGAGCTGACCAA<br>GAACCAGGTCAGCCTGA<br>CCTGCCCTGGTCAAAGGCT<br>TCTATCCCAGCGACATCG<br>CCGTGGAGTGGGAGAGC<br>AATGGGCAGCCGGAGAA<br>CAACTACAAGACCACGC<br>CTCCCGTGTTGGACTCCG<br>ACGGCTCCTTCTTCTCT<br>ACAGCAAGCTCACCCTG |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                         |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                         |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | GACAAGAGCAGGTGGCA<br>GCAGGGGAACGTCTTCTC<br>ATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTA<br>CACGCAGAAGAGCCTCT<br>CCCTGTCTCCCGGAAA<br>(SEQ ID NO: 286)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| PRD<br>-<br>1174 | GVSDVPRDLEVV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEIES<br>PKAQASSVPTAQ<br>PQAEGLAKTHTC<br>PPCPAPPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKC<br>KVSINKALPAPIE<br>KTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQK<br>SLSLSPGK (SEQ<br>ID NO: 255) | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWTLPHAGRA<br>HYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVP<br>GRGVATISGL<br>KPGVDYTITVY<br>AVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>275) | ESPKAQASS<br>VPTAQQA<br>EGLA (SEQ<br>ID NO: 183) | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAAGTGG<br>TGGCTGTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCTCCTGGA<br>CACTGCCTCACGCTGGCC<br>GGGCTCATTACTATAGAA<br>TTACCTACGGGGAGACA<br>GGCGGGAACCTCTCCCGT<br>GCAGGAATTCACCGTGC<br>CTGGAAGGGGCGTGACT<br>GCCACCATCAGTGGGCT<br>GAAGCCAGGAGTGACT<br>ACACAATTACCGTGACTG<br>CTGTGACTGTACCACAA<br>CTAAAGTGATCCACTACA<br>AACCCTCTCTATTAATT<br>ATCGGACCGAAATTGAG<br>TCTCAAAGGCTCAGGCC<br>AGCTCCGTGCCTACCGCT<br>CAGCCACAGGCTGAGGG<br>CCTGGCTAAGACCCACA<br>CATGCCCCCTTGTCAG<br>CTCCCGAACTGCTGGGCG<br>GGCCTTCAGTCTTCTCT<br>TCCCCCAAACCCAAG<br>GACACCCTCATGATCTCC<br>CGGACCCTGAGGTCAC<br>ATGCGTGGTGGTGGACG<br>TGAGCCACGAAGACCCT<br>GAGGTCAAGTTCAACTG<br>GTACGTGGACGGCGTGG |

|                  |                                                                                                                             |                                                                                                                    |                                 |                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                             |                                                                                                                    |                                 |                                                                                                                            | AGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGA<br>GCAGTACAACAGCACGT<br>ACCGTGTGGTCAGCGTCC<br>TCACCGTCCTGCACCAGG<br>ACTGGCTGAATGGCAAG<br>GAGTACAAGTGC AAGGT<br>CTCCAACAAAGCCCTCCC<br>AGCCCCATCGAGAAAA<br>CCATCTCCAAAGCCAAA<br>GGGCAGCCCCGAGAACC<br>ACAGGTGTACACCCTGCC<br>CCCATCCCGGGATGAGCT<br>GACCAAGAACCAGGTCA<br>GCCTGACCTGCCTGGTCA<br>AAGGCTTCTATCCAGCG<br>ACATCGCCGTGGAGTGG<br>GAGAGCAATGGGCAGCC<br>GGAGAACAAC TACAAGA<br>CCACGCCTCCCGTGCTGG<br>ACTCCGACGGCTCCTTCT<br>TCCTCTACAGCAAGCTCA<br>CCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGT<br>CTTCTCATGCTCCGTGAT<br>GCATGAGGCTCTGCACA<br>ACCACTACACGCAGAAG<br>AGCCTCTCCCTGTCTCCC<br>GGGAAA (SEQ ID NO:<br>287) |
| PRD<br>-<br>1175 | DKTHTCP PCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL | DKTHTCP PCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS | GAGGGGSG<br>(SEQ ID NO:<br>181) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEI | GACAAAAC TACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACTCCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGACGTGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>GAGGGSGGVS<br>DVPRDLEVVAAT<br>PTSLISWTLPHA<br>GRAHYRITYGE<br>TGGNSPVQEFTV<br>PGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYA<br>VTVTTTKVIHYK<br>PISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 256) | VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | (SEQ ID NO: 275) | CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGG<br>CGCCGGAGGCGGCGGAT<br>CCGGTGGCGTGTCCGAC<br>GTGCCCCGGGATCTAGA<br>AGTGGTGGCTGCTACCCC<br>CACAAGCTTGCTGATCTC<br>CTGGACACTGCCTCACGC<br>TGGCCGGGCTCATTACTA<br>TAGAATTACCTACGGGG |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                 | AGACAGGCGGGAAGTCT<br>CCCGTGCAGGAATTCACC<br>GTGCCTGGAAGGGGCGT<br>GACTGCCACCATCAGTG<br>GGCTGAAGCCAGGAGTG<br>GACTACACAATTACCGTG<br>TACGCTGTGACTGTGACC<br>ACAACTAAAGTGATCCA<br>CTACAAACCCATCTCTAT<br>TAATTATCGGACCGAAAT<br>C (SEQ ID NO: 288)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| PRD<br>-<br>1177 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>DGELDGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWTLPHAGRA<br>HYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPGR<br>GVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTV | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMIEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 275) | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGGTACACCCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC |

|                  |                                                                                        |                                                                                    |                                  |                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | TTTKVIHYKPISI<br>NYRTEI (SEQ ID<br>NO: 257)                                            |                                                                                    |                                  |                                                                                             | ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCAACAAGC<br>TTGCTGATCTCCTGGACA<br>CTGCCTCAGCTGGCCGG<br>GCTCATTACTATAGAATT<br>ACCTACGGGGAGACAGG<br>CGGGAACCTCCCGTGCA<br>GGAATTCACCGTGCCTGG<br>AAGGGGCGTGAAGTCCA<br>CCATCAGTGGGCTGAAG<br>CCAGGAGTGGACTACAC<br>AATTACCGTGTACGCTGT<br>GACTGTGACCACAACCTA<br>AAGTGATCCACTACAAA<br>CCCATCTCTATTAATTAT<br>CGGACCGAAATT (SEQ<br>ID NO: 289) |
| PRD<br>-<br>1178 | DKTHTCPAP<br>ELLGGPSVFLFP<br>KPKDTLMISRT<br>EVTCTVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP | DKTHTCPAP<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV | GQDEPGG<br>S (SEQ ID<br>NO: 185) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACTCCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>GQPDEPGSGVS<br>DVPRDLEVVAAT<br>PTSLISWTLPHA<br>GRAHYRITYGE<br>TGGNSPVQEFTV<br>PGRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVYA<br>VTVTTTKVIHYK<br>PISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 258) | HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | YAVTVTTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 275) | ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCGTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCCACA<br>GGTGTACACCCGTGCCCC<br>ATCCCGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTACGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGG<br>CCAGCCCGACGAGCCTG<br>GCGGGAGCGCGTGAGC<br>GACGTGCCACGGGATCT<br>AGAAGTGGTGGCTGCTA<br>CCCCACAAGCTTGCTGA<br>TCTCTGGACACTGCCTC |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                          |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                          |                                                                                                                                                | ACGCTGGCCGGGCTCATT<br>ACTATAGAATTACCTACG<br>GGGAGACAGGCGGGAAC<br>TCTCCCGTGCAGGAATTC<br>ACCGTGCCTGGAAGGGG<br>CGTGACTGCCACCATCAG<br>TGGGCTGAAGCCAGGAG<br>TGGACTACACAATTACCG<br>TGTACGCTGTGACTGTGA<br>CCACAATAAAGTGATC<br>CACTACAAACCCATCTCT<br>ATTAATTATCGGACCGAA<br>ATT (SEQ ID NO: 290)                                                                                                                                                                                                                                                  |
| PRD<br>-<br>1180 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRT<br>EVTCTVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMIIEALII<br>NHYTQKSLSLSP<br>GGSGSGSGSGSG<br>SGVSDVPRDLEV<br>VAATPTSLISW<br>TLPHAGRAHY<br>RITYGETGGNSP<br>VQEFTVPGRGVT | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | GGSGSGSG<br>SGSGS<br>(SEQ ID NO:<br>186) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTIIV<br>YAVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 275) | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCCAAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGTGTACACCCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTACAG |

|                  |                                                                          |                                                          |                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | ATISGLKPGVDY<br>TITVYAVTVTTT<br>KVIHYKPISINYR<br>TEI (SEQ ID NO:<br>259) |                                                          |                                              |                                                             | CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGG<br>CGGCAGCGGGTCTGGAT<br>CTGGCAGTGGGAGCGGC<br>TCTGGCGTGAGCGACGT<br>GCCACGGATCTAGAAG<br>TGGTGGCTGCTACCCCA<br>CAAGCTTGCTGATCTCCT<br>GGACACTGCCTACGCTG<br>GCCGGGCTCATTACTATA<br>GAATTACCTACGGGAG<br>ACAGGCGGGAACCTCTCC<br>CGTGCAGGAATTCACCGT<br>GCCTGGAAGGGCGTGA<br>CTGCCACCATCAGTGGGC<br>TGAAGCCAGGAGTGGAC<br>TACACAATTACCGTGTAC<br>GCTGTGACTGTGACCACA<br>ACTAAAGTGATCCACTAC<br>AAACCCATCTCTATTAAT<br>TATCGGACCGAAATT<br>(SEQ ID NO: 291) |
| PRD<br>-<br>1284 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVVDVSHE           | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWDA<br>PRGLARYYRITY<br>GETGGNSPVQEF | GACAAAACCTACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAEEAQ<br>DGELDGVS DVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWDAPRGLAR<br>YYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVFGRG<br>TTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTID<br>RDGTRSFDPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 260) | DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) |  | TVFGRGTTATISG<br>LKPGVDYTITVY<br>AVTIDRDGTRSF<br>DPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 277) | CCCCAAAACCCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACACAC<br>GGGTGTACACCCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                              |                                                                                                                                                | GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGGAC<br>GCTCCGAGAGGTCTGGCT<br>CGATATTACCGCATCACT<br>TACGGCGAAACAGGAGG<br>CAATAGCCCTGTCCAGG<br>AGTTCAGTGTGTTCCGGTC<br>GTGGTACCACAGCTACC<br>ATCAGCGGCCCTTAAACCT<br>GGCGTTGATTATACCATC<br>ACTGTGTATGCTGTCACT<br>ATCGACCGTGACGGTAC<br>CCGCAGCTTCGACCCAAT<br>TTCCATTAATTACGGGAC<br>CGAAATT (SEQ ID NO:<br>292)                                                                                                     |
| PRD<br>-<br>1285 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>DGELDGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO: | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWDA<br>PAGLARYRITY<br>GETGGNSPVQEF<br>TVVGRGNTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTIFRDGPVT<br>WDPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 278) | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCCTGCACAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA |

|  |                                                                                                                            |      |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | LISWDAPAGLAR<br>YYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVVGRG<br>NTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIFR<br>DGPVTWDPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 261) | 276) |  |  | GGTGTACACCCTGCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGGAC<br>GCTCCGGCTGGTCTGGCT<br>CGATATTACCGCATCACT<br>TACGGCGAAACAGGAGG<br>CAATAGCCCTGTCCAGG<br>AGTTCACTGTGGTCGGTC<br>GTGGTAACACAGCTACC<br>ATCAGCGGCCTTAAACCT<br>GGCGTTGATTATACCATC<br>ACTGTGTATGCTGTCACT<br>ATCTTCGTGACGGTCCC<br>GTCACCTGGGACCCAATT<br>TCCATTAATTACCGGACC<br>GAAATT (SEQ ID NO: 293) |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PRD<br>-<br>1286 | DKTHTCPPCAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMIS RTP<br>EVT CVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>DGELDGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWDAPKGLAR<br>YYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVVGRG<br>NTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIFR<br>DGPVTWDPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 262) | DKTHTCPPCAP<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWDA<br>PKGLARYYRITY<br>GETGGNSPVQEF<br>TVVGRGNTATIS<br>GLKPGVDYITIV<br>YAVTIFRDGPVT<br>WDPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 279) | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGG<br>TCAAGTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCTGCACCAAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACACCA<br>GGTGTACACCCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC<br>ACGCCTCCCCTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACAGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCCTGTCTCCGA |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                              |                                                                                                                                                | GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCAACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGGAC<br>GCTCCGAAGGGTCTGGCT<br>CGATATTACCGCATCACT<br>TACGGCGAAACAGGAGG<br>CAATAGCCCTGTCCAGG<br>AGTTCACTGTGGTCGGTC<br>GTGGTAACACAGCTACC<br>ATCAGCGGCCTTAAACCT<br>GGCGTTGATTATACCATC<br>ACTGTGTATGCTGTCACT<br>ATCTTCGTGACGGTCCC<br>GTCACCTGGGACCAATT<br>TCCATTAATTACCGGACC<br>GAAATT (SEQ ID NO: 294) |
| PRD<br>-<br>1287 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRT<br>EVTCTVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVV<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWSL<br>PNPGNAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVDTGFIG<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 280) | GACAAAACACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC                                                           |

|                                                                                                                                                                                             |                                                                   |  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>DGELDGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWSLPNPGNA<br>HYYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPGR<br>GVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTV<br>TDTGFITYKPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 263) | DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) |  |  |  | AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACACAC<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGTCT<br>CTGCCGAATCCGGGTAA<br>CGCCCATTATTACCGCAT<br>CACTTACGGCGAAACAG<br>GAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCT<br>GGTCGTGGTGTTACAGCT<br>ACCATCAGCGGCCTTAA<br>ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTACTGACACAGG<br>TTTCATCACGTACAAACC |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                              |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                              |                                                                                                                                                 | AATTTCCATTAATTACCG<br>GACCGAAATT (SEQ ID<br>NO: 295)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| PRD<br>-<br>1288 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>DGELDGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWSLPHQGKA<br>NYYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPGR<br>GVTATISGLKPG<br>VDYITIVYAVTV<br>TDTGYLKYKPISI<br>NYRTEI (SEQ ID<br>NO: 264) | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAIEKTI<br>SKAKGQPREPO<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | ELQLEESAA<br>EAQDGELD<br>(SEQ ID NO:<br>184) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWSL<br>PHQKGANYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTDTGYLK<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 281) | GACAAAACACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCTCACC<br>GTCCTGCACCAAGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGAAGGTCTCC<br>AACAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT |

|                  |                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                         |                               |                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                         |                               |                                                                                                                                                                                                                 | TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GACGGAGAACTGGATGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGTCT<br>CTGCCGCACCAAGGTAA<br>AGCCAATTATTACCGCAT<br>CACTTACGGCGAAACAG<br>GAGGCAATAGCCTGTC<br>CAGGAGTTCAGTGCCT<br>GGTCGTGGTGTTACAGCT<br>ACCATCAGCGGCCTTAA<br>ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTACTGATACAGG<br>GTACCTCAAGTACAAAC<br>CAATTTCCATTAATTACC<br>GGACCGAAATT (SEQ ID<br>NO: 296) |
| PRD<br>-<br>1301 | GVSDVPRDLEVV<br>AATPTSLISWD<br>APRGLARYYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVFRGTTATIS<br>GLKPGVDYTTIV<br>YAVTIDRDGTRS<br>FDPISINYRTEIEP<br>KSSDKTHTCPPE<br>PAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWY | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWDAPRGLAR<br>YYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVFG<br>RGTATISGLK<br>PGVDYTTIVYA<br>VTIDRDGTRSF<br>DPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>277) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPPEPPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VIINAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAGTGG<br>TGGCTGCTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCAGCTGGG<br>ACGCTCCGAGAGGTCTG<br>GCTCGATATTACCGCATC<br>ACTTACGGCGAAACAGG<br>AGGCAATAGCCTGTCC<br>AGGAGTTCAGTGTGTTCC<br>GTCGTGGTACCACAGCTA<br>CCATCAGCGGCCTTAAAC<br>CTGGCGTTGATTATACCA<br>TCACTGTGTATGCTGTCA                                                                                                                                                                                                                                                      |



|                                                                                                                                                                                                                                                     |  |  |                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQD<br>WLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTK<br>NQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTPP<br>VLDSGDSFLYS<br>KLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLS<br>LSPGK (SEQ ID<br>NO: 265) |  |  | WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | CTATCGACCGTGACGGTA<br>CCCGCAGCTTCGACCCAA<br>TTTCATTAATTACCGGA<br>CCGAAATTGAGCCTAAG<br>AGCTCCGACAAAACCCA<br>CACATGCCACCTTGTC<br>AGCCCCGAACTGCTGG<br>GCGGCCCTTCAGTCTTCC<br>TCTTCCCCCAAAACCCA<br>AGGACACCCTCATGATCT<br>CCCGGACCCCTGAGGTC<br>ACATGCGTGGTGGTGGA<br>CGTGAGCCACGAAGACC<br>CTGAGGTCAAGTTCAACT<br>GGTACGTGGACGGCGTG<br>GAGGTGCATAATGCCAA<br>GACAAAGCCGCGGGAGG<br>AGCAGTACAACAGCACG<br>TACCGTGTGGTCAGCGTC<br>CTCACCGTCCTGCACCAG<br>GACTGGCTGAATGGCAA<br>GGAGTACAAGTGCAAGG<br>TCTCCAACAAAGCCCTCC<br>CAGCCCCATCGAGAAA<br>ACCATCTCCAAAGCCAA<br>AGGGCAGCCCCGAGAAC<br>CACAGGTGTACACCCTGC<br>CCCCATCCCGGGATGAG<br>CTGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGT<br>CAAAGGCTTCTATCCCAG<br>CGACATCGCCGTGGAGT<br>GGGAGAGCAATGGGCAG<br>CCGGAGAACAACCTACAA<br>GACCACGCCTCCCGTGTT<br>GGACTCCGACGGCTCCTT<br>CTTCCTCTACAGCAAGCT<br>CACCGTGGACAAGAGCA<br>GGTGGCAGCAGGGGAAC |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | GTCTTCTCATGCTCCGTG<br>ATGCATGAGGCTCTGCAC<br>AACCACTACACGCAGAA<br>GAGCCTCTCCCTGTCTCC<br>CGGGAAA (SEQ ID NO:<br>297)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| PRD<br>-<br>1302 | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWD<br>APAGLARYYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVVGRGNTATI<br>SGLKPGVDYTIT<br>VYAVTIFRDGPV<br>TWDPIISINYRTEI<br>EPKSSDKTHTCP<br>PCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKC<br>KVSNNKALPAIE<br>KTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRW<br>QQGNVVFSCSV<br>HEALHNHYTQK<br>SLSLSPGK (SEQ<br>ID NO: 266) | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWDAPAGLAR<br>YYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVVG<br>RGNTATISGLK<br>PGVDYTITVYA<br>VTIFRDGPVTW<br>DPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>278) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSLKTVDKSR<br>WQQGNVVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAGTGG<br>TGGCTGCTACCCACAA<br>GCTTGCTGATCAGCTGGG<br>ACGCTCCGGCTGGTCTGG<br>CTCGATATTACCGCATCA<br>CTTACGGCGAACAGGA<br>GGCAATAGCCCTGTCCA<br>GGAGTTCACTGTGGTCGG<br>TCGTGGTAACACAGCTAC<br>CATCAGCGGCCTTAAACC<br>TGGCGTTGATTATACCAT<br>CACTGTGTATGCTGTAC<br>TATCTTCCGTGACGGTCC<br>CGTCACCTGGGACCCAAT<br>TTCCATTAATTACCGGAC<br>CGAAATTGAGCCTAAGA<br>GCTCCGACAAAACCCAC<br>ACATGCCCACCTTGTTCA<br>GCCCCGAACTGCTGGG<br>CGGCCCTTCAGTCTTCCT<br>CTTCCCCCAAAACCCAA<br>GGACACCCTCATGATCTC<br>CCGGACCCCTGAGGTCA<br>CATGCGTGGTGGTGGAC<br>GTGAGCCACGAAGACCC<br>TGAGGTCAAGTTCAACTG<br>GTACGTGGACGGCGTGG<br>AGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGA<br>GCAGTACAACAGCACGT<br>ACCGTGTGGTCAGCGTCC |

|                  |                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                               | TCACCGTCCTGCACCAGG<br>ACTGGCTGAATGGCAAG<br>GAGTACAAGTGAAGGT<br>CTCCAACAAAGCCCTCCC<br>AGCCCCCATCGAGAAAA<br>CCATCTCCAAAGCCAAA<br>GGGCAGCCCCGAGAACC<br>ACAGGTGTACACCCTGCC<br>CCCATCCCGGGATGAGCT<br>GACCAAGAACAGGTCA<br>GCCTGACCTGCCTGGTCA<br>AAGGCTTCTATCCCAGCG<br>ACATCGCCGTGGAGTGG<br>GAGAGCAATGGGCAGCC<br>GGAGAACAATAACAAGA<br>CCACGCCTCCCGTGTGG<br>ACTCCGACGGCTCCTTCT<br>TCCTCTACAGCAAGCTCA<br>CCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGT<br>CTTCTCATGCTCCGTGAT<br>GCATGAGGCTCTGCACA<br>ACCACTACACGAGAAG<br>AGCCTCTCCCTGTCTCCC<br>GGGAAA (SEQ ID NO:<br>298) |
| PRD<br>-<br>1303 | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWD<br>APKGLARYYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVVGRGNTATI<br>SGLKPGVDYTIT<br>VYAVTIFRDGPV<br>TWDPIISINYRTEI<br>EPKSSDKTHTCP<br>PCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVV | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWDAPKGLAR<br>YYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVVG<br>RGNTATISGLK<br>PGVDYTITVYA<br>VTIFRDGPVTW<br>DPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>279) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPAPPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAGTGG<br>TGGCTGCTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCAGCTGGG<br>ACGCTCCGAAGGGTCTG<br>GCTCGATATTACCGCATC<br>ACTACGGCGAAACAGG<br>AGGCAATAGCCCTGTCC<br>AGGAGTTCACTGTGGTCG<br>GTCGTGGTAACACAGCT<br>ACCATCAGCGGCCTTAA<br>ACCTGGCGTTGATTATAC                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKC<br>KVS NKALPAPIE<br>KTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFLL<br>YSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQK<br>SLSLSPGK (SEQ<br>ID NO: 267) |  |  | VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTATCTTCCGTGACGG<br>TCCCGTCACCTGGGACCC<br>AATTTCCATTAATTACCG<br>GACCGAAATTGAGCCTA<br>AGAGCTCCGACAAAACC<br>CACACATGCCCACCTTGT<br>CCAGCCCCCGAACTGCTG<br>GGCGGCCCTTCAGTCTTC<br>CTCTTCCCCCAAAACCC<br>AAGGACACCCCTCATGAT<br>CTCCCGGACCCCTGAGGT<br>CACATGCGTGGTGGTGG<br>ACGTGAGCCACGAAGAC<br>CCTGAGGTCAAGTTCAAC<br>TGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCA<br>AGACAAAGCCGCGGGAG<br>GAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGTGTCAGCGT<br>CCTACCGTCTGACCA<br>GGACTGGCTGAATGGCA<br>AGGAGTACAAGTCAAG<br>GTCTCCAACAAAGCCCTC<br>CCAGCCCCATCGAGAA<br>AACCATCTCAAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAA<br>CCACAGGTGTACACCCTG<br>CCCCCATCCCGGATGA<br>GCTGACCAAGAACCAGG<br>TCAGCCTGACCTGCCTGG<br>TCAAAGGCTTCTATCCCA<br>GCGACATCGCCGTGGAG<br>TGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACAACACTACA<br>AGACCACGCTCCCGTGT<br>TGGACTCCGACGGCTCCT<br>TCTTCTCTACAGCAAGC<br>TCACCGTGGACAAGAGC |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                           |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                           |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | AGGTGGCAGCAGGGGAA<br>CGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGC<br>ACAACCACTACACGCAG<br>AAGAGCCTCTCCCTGTCT<br>CCCGGAAA (SEQ ID<br>NO: 299)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| PRD<br>-<br>1304 | GVSDVPRDLEVV<br>AATPTSLISWSL<br>PNPGNAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPRGRVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTDTGFI<br>YKPIISINYRTEIEP<br>KSSDKTHTCPPC<br>PAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWY<br>VDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTK<br>NQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTPP<br>VLDSDGSFTFLYS<br>KLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMH<br>ALHNHYTQKSLS<br>LSPGK (SEQ ID<br>NO: 268) | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLLI<br>SWSLPNPGNA<br>HYYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVP<br>GRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVY<br>AVTVTDTGFI<br>YKPIISINYRTEI<br>(SEQ ID NO:<br>280) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTP EVT<br>CVVVDVSHEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAAGTGG<br>TGGCTGTACCCCCACAA<br>GCTTGCTGATCAGCTGGT<br>CTTGCCGAATCCGGGTA<br>ACGCCATTATTACCGCA<br>TCACTTACGGCGAAACA<br>GGAGGCAATAGCCCTGT<br>CCAGGAGTTCACTGTGCC<br>TGGTCGTGGTGTTACAGC<br>TACCATCAGCGCCTTAA<br>ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTTACTGACACAGG<br>TTTCATCAGTACAAACC<br>AATTTCCATTAATTACCG<br>GACCGAAATTGAGCCTA<br>AGAGCTCCGACAAAACC<br>CACACATGCCCACCTTGT<br>CCAGCCCCGAACTGCTG<br>GGCGGCCCTTCAGTCTTC<br>CTCTTCCCCCAAAACCC<br>AAGGACACCTCATGAT<br>CTCCCGGACCCCTGAGGT<br>CACATGCGTGGTGGTGG<br>ACGTGAGCCACGAAGAC<br>CCTGAGGTCAAGTTCAAC<br>TGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCA<br>AGACAAAGCCGCGGGAG<br>GAGCAGTACAACAGCAC |

|                  |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                           |                               |                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                           |                               |                                                                                                                                                                                  | GTACCGTGTGGTCAGCGT<br>CCTCACCCTCCTGCACCA<br>GGACTGGCTGAATGGCA<br>AGGAGTACAAGTGCAAG<br>GTCTCCAACAAAGCCCTC<br>CCAGCCCCATCGAGAA<br>AACCATCTCCAAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAA<br>CCACAGGTGTACACCCTG<br>CCCCCATCCCGGGATGA<br>GCTGACCAAGAACCAGG<br>TCAGCCTGACCTGCCTGG<br>TCAAAGGCTTCTATCCCA<br>GCGACATCGCCGTGGAG<br>TGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACAACCTACA<br>AGACCACGCCTCCCGTGT<br>TGGACTCCGACGGCTCCT<br>TCTTCCTCTACAGCAAGC<br>TCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAA<br>CGTCTTCTCATGTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGC<br>ACAACCCTACACGCAG<br>AAGAGCCTCTCCCTGTCT<br>CCCGGAAA (SEQ ID<br>NO: 300) |
| PRD<br>-<br>1305 | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWSL<br>PHQGKANYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTDGTGYL<br>KYKPISINYRTEI<br>EPKSSDKHTTCP<br>PCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTL | GVSDVPRDLE<br>VVAATPTSLI<br>SWSLPHQGKA<br>NYRITYGETG<br>GNSPVQEFTVP<br>GRGVTATISGL<br>KPGVDYTITVY<br>AVTVTDGTGYL<br>KYKPISINYRTE<br>I (SEQ ID NO:<br>281) | EPKSSD<br>(SEQ ID NO:<br>182) | KTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSIIEDPE<br>VKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRD | GGCGTGAGCGACGTGCC<br>CCGGGATCTAGAAGTGG<br>TGGCTGCTACCCCAACA<br>GCTTGCTGATCAGCTGGT<br>CTTGCCGCACCAAGGTA<br>AAGCCAATTATTACCGCA<br>TCACTTACGGCGAAACA<br>GGAGGCAATAGCCCTGT<br>CCAGGAGTTCACTGTGCC<br>TGGTCGTGGTGTACAGC<br>TACCATCAGCGGCCTTAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKC<br>KVS NKALPAPIE<br>KTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFLL<br>YSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQK<br>SLSLSPGK (SEQ<br>ID NO: 269) |  |  | ELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPGK<br>(SEQ ID NO: 283) | ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTACTGATACAGG<br>GTACCTCAAGTACAAAC<br>CAATTTCCATTAATTACC<br>GGACCGAAATTGAGCCT<br>AAGAGCTCCGACAAAAC<br>CCACACATGCCCACCTTG<br>TCCAGCCCCCGAACTGCT<br>GGGCGGCCCTTCAGTCTT<br>CCTCTTCCCCCAAAC<br>CAAGGACACCTCATGA<br>TCTCCCGGACCCCTGAGG<br>TCACATGCGTGGTGGTGG<br>ACGTGAGCCACGAAGAC<br>CCTGAGGTCAAGTTCAAC<br>TGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCA<br>AGACAAAGCCGCGGGAG<br>GAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGGTCAGCGT<br>CCTACCGTCCTGCACCA<br>GGACTGGCTGAATGGCA<br>AGGAGTACAAGTGCAAG<br>GTCTCCAACAAGCCCTC<br>CCAGCCCCATCGAGAA<br>AACCATCTCAAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAA<br>CCACAGGTGTACACCCTG<br>CCCCCATCCCGGGATGA<br>GCTGACCAAGAACCAGG<br>TCAGCCTGACCTGCCTGG<br>TCAAAGGCTTCTATCCCA<br>GCGACATCGCCGTGGAG<br>TGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACAACCTACA<br>AGACCACGCCTCCCGTGT<br>TGGACTCCGACGGCTCCT<br>TCTTCTCTACAGCAAGC |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                | TCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAA<br>CGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGC<br>ACAACCACTACACGCAG<br>AAGAGCCTCTCCCTGTCT<br>CCCGGGAAA (SEQ ID<br>NO: 301)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| PRD<br>-<br>1471 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVV<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>EGELEGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWTLPIIAGRA<br>HYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPGR<br>GVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTV<br>TTTKVIHYKPISI<br>NYRTEI (SEQ ID<br>NO: 270) | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | ELQLEESAA<br>EAQEGELE<br>(SEQ ID NO:<br>187) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWTL<br>PHAGRAHYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS<br>GLKPGVDYITIV<br>YAVTVTTKVIH<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 275) | GACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACACCA<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATGCCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC |



|                  |                                                                                                                               |                                                                                                                  |                                              |                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                               |                                                                                                                  |                                              |                                                                                                                             | ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GAAGGAGAACTGGAAGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCTCCTGGACA<br>CTGCCCTACGCTGGCCGG<br>GCTCATTACTATAGAATT<br>ACCTACGGGGAGACAGG<br>CGGGAACCTCTCCGTGCA<br>GGAATTCACCGTGCCTGG<br>AAGGGGCGTGACTGCCA<br>CCATCAGTGGGCTGAAG<br>CCAGGAGTGGACTACAC<br>AATTACCGGTACGCTGT<br>GACTGTGACCACAATA<br>AAGTGATCCACTACAAA<br>CCCATCTCTATTAATTAT<br>CGGACCGAAATT (SEQ<br>ID NO: 302) |
| PRD<br>-<br>1472 | DKTIITCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMIS RTP<br>EVT CVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL | DKTIITCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTPREE<br>QYNSTYRVVS | ELQLEESAA<br>EAQEGELE<br>(SEQ ID NO:<br>187) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWDA<br>PAGLARYYRITY<br>GETGGNSPVQEF<br>TVVGRGNTATIS<br>GLKPGVDYTITV<br>YAVTIFRDGPVT<br>WDPISINYRTEI | GACAAAACCTACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAATCCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                      |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTPPVVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>EGELEGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWDAPAGLAR<br>YYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVVGRG<br>NTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTIFR<br>DGPVTWDPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 271) | VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | (SEQ ID NO: 278) | CCACGAAGACCCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCCT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGTGTACACCCTGCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACCTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GAAGGAGAACTGGAAGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCAACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGGAC<br>GCTCCGGCTGGTCTGGCT |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                                                                                                                                 | CGATATTACCGCATCACT<br>TACGGCGAAACAGGAGG<br>CAATAGCCCTGTCCAGG<br>AGTTCAGTGTGGTCGGTC<br>GTGGTAACACAGCTACC<br>ATCAGCGGCCTTAAACCT<br>GGCGTTGATTATACCATC<br>ACTGTGTATGCTGTCACT<br>ATCTTCCGTGACGGTCCC<br>GTCACCTGGGACCCAATT<br>TCCATTAATTACCGGACC<br>GAAATT (SEQ ID NO: 303)                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| PRD<br>-<br>1473 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRT<br>EVTCTVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>EGELEGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWDAPKGLAR<br>YYRITYGETGGN<br>SPVQEFVVVGRG<br>NTATISGLKPGV | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTTPVLDS<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) | ELQLEESAA<br>EAQEGELE<br>(SEQ ID NO:<br>187) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWDA<br>PKGLARYYRITY<br>GETGGNSPVQEF<br>TVVGRGNTATIS<br>GLKPGVDYITIV<br>YAVTIFRDGPVT<br>WDPIISINYTEI<br>(SEQ ID NO: 279) | GACAAAACACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAACCTCTGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC<br>ACCCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCCAGC<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACACACA<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA |

|                  |                                                                               |                                                                         |                                              |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | DYTITVYAVTIFR<br>DGPVTWDPISIN<br>YRTEI (SEQ ID<br>NO: 272)                    |                                                                         |                                              |                                                                            | GGCTTCTATCCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGTGAGGCTCAG<br>GAAGGAGAACTGGAAGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG<br>GCTGCTACCCCCACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGGAC<br>GCTCCGAAGGTCTGGCT<br>CGATATTACGCATCACT<br>TACGGCGAAACAGGAGG<br>CAATAGCCCTGTCCAGG<br>AGTTCACTGTGGTCGGTC<br>GTGGTAACACAGCTACC<br>ATCAGCGGCCTTAAACCT<br>GGCGTTGATTATACCATC<br>ACTGTGTATGCTGTCACT<br>ATCTTCCGTGACGGTCCC<br>GTCACCTGGGACCCAATT<br>TCCATTAATTACCGGACC<br>GAAATT (SEQ ID NO: 304) |
| PRD<br>-<br>1474 | DKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTP<br>EVTCTVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVD | DKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI<br>SRTPVETCVVV<br>DVSHEDPEVKF | ELQLEESAA<br>EAQEGELE<br>(SEQ ID NO:<br>187) | GVSDVPRDLEV<br>AATPTSLISWSL<br>PHQKANYRIT<br>YGETGGNSPVQE<br>FTVPGRGVTATIS | GACAAAACACACATG<br>CCCACCGTGCCAGCACC<br>TGAATCCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCTCTTCC<br>CCCCAAAACCAAGGAC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYT<br>LPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVL<br>DSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSP<br>ELQLEESAAEAQ<br>EGELEGVSDVPR<br>DLEVVAATPTSL<br>LISWSLPHQGKA<br>NYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPGR<br>GVTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTV<br>TDTGYLKYKPISI<br>NYRTEI (SEQ ID<br>NO: 273) | NWYVDGVEV<br>HNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENN<br>YKTTPPVLDSD<br>GSFFLYSKLTV<br>DKSRLWQQGNV<br>FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSL<br>SP (SEQ ID NO:<br>276) |  | GLKPGVDYTITV<br>YAVTVTDTGYLK<br>YKPISINYRTEI<br>(SEQ ID NO: 281) | ACCCTCATGATCTCCCGG<br>ACCCCTGAGGTACACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGG<br>TCAAGTTCAACTGGTACG<br>TGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGT<br>GTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTG<br>GCTGAATGGCAAGGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTCTCC<br>AACAAAGCCCTCCACG<br>CCCCATCGAGAAAACCA<br>TCTCCAAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACA<br>GGTGTACACCTGCCCCC<br>ATCCCGGGATGAGCTGA<br>CCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCAGCGAC<br>ATCGCCGTGGAGTGGGA<br>GAGCAATGGGCAGCCGG<br>AGAACAACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGAC<br>TCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACC<br>GTGGACAAGAGCAGGTG<br>GCAGCAGGGGAACGTCT<br>TCTCATGTCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAAC<br>CACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGA<br>GCTGCAGCTGGAGGAAA<br>GCGCCGCTGAGGCTCAG<br>GAAGGAGAACTGGAAGG<br>CGTGAGCGACGTGCCAC<br>GGGATCTAGAAGTGGTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                  | GCTGCTACCCCAACAAGC<br>TTGCTGATCAGCTGGTCT<br>CTGCCGACCAAGGTAA<br>AGCCAATTATTACCGCAT<br>CACTTACGGCGAAACAG<br>GAGGCAATAGCCCTGTC<br>CAGGAGTTCACTGTGCCT<br>GGTCGTGGTGTTACAGCT<br>ACCATCAGCGGCCTTAA<br>ACCTGGCGTTGATTATAC<br>CATCACTGTGTATGCTGT<br>CACTGTACTGATACAGG<br>GTACCTCAAGTACAAAC<br>CAATTTCCATTAATTACC<br>GGACCGAAATT (SEQ ID<br>NO: 305)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

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

Таблица 7

| Сводная таблица иллюстративных последовательностей |                                             |          |                    |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------|--------------------|
| SEQ ID NO                                          | Описание                                    | Название | Последовательность |
| 306                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT1    | MGVSDVPRDL         |
| 307                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT2    | GVSDVPRDL          |
| 308                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT3    | VSDVPRDL           |
| 309                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT4    | SDVPRDL            |
| 310                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT5    | DVPRDL             |
| 311                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT6    | VPRDL              |
| 312                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT7    | PRDL               |
| ---                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT8    | RDL                |
| ---                                                | Иллюстративная лидерная последовательность  | AdNT9    | DL                 |
| 211                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT1    | EIDKPSQ            |
| ---                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT2    | EI                 |
| 313                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT3    | EIEPKSS            |
| 314                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT4    | EIDKPC             |
| 315                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT5    | EIDKP              |
| 316                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT6    | EIDK               |
| 317                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT7    | EIDKPS             |
| 318                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT8    | EIEKPSQ            |
| 319                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT9    | EIDKPSQLE          |
| 320                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT10   | EIEDEDEDEDED       |
| 321                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT11   | EGSGS              |
| 322                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT12   | EIDKPCQ            |
| 189                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT13   | GSGC               |
| 323                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT14   | EGSGC              |
| 324                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT15   | EIDKPCQLE          |
| 325                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT16   | EIDKPSQHNNNNNN     |
| 326                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT17   | GSGCHNNNNNN        |
| 327                                                | Иллюстративная хвостовая последовательность | AdCT18   | EGSGCHNNNNNN       |
| 328                                                | Метка                                       | T1       | NNNNNN             |

#### IV. Технология слияния нуклеиновых кислот-белков

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен аднектин, содержащий домены фибронектина типа III, который связывается с миостатином. Один из способов быстро получить и проверить домены Fn3 со специфическими связывающими свойствами представляет собой технологию слияния нуклеиновых кислот-белков Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company. В настоящем раскрытии используется технология экспрессии и мечения *in vitro*, называемая "PROfusion", которая применяет слияния нуклеиновых кислот-белков (слияния РНК- и ДНК-белков), чтобы идентифицировать новые полипептиды и мотивы аминокислот, которые важны для связывания с белками. Технология слияния нуклеиновых кислот-белков представляет собой технологию, которая ковалентно образует пары белка с его кодирующей генетической информацией. Для более подробного описания технологии слияния РНК-белок и способов скрининга библиотеки основанных на фибронектине каркасных белков смотрите Szostak et al., U.S. Pat. Nos. 6,258,558, 6,261,804, 6,214,553, 6,281,344, 6,207,446, 6,518,018 and 6,818,418; Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1997; 94:12297-12302 и Kurz et al., Molecules, 2000; 5:1259-64, все из которых

включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### **V. Векторы и полинуклеотиды**

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из описанных в настоящем документе различных белков или полипептидов, могут быть синтезированы химически. Использование кодонов может быть выбрано таким образом, чтобы повысить экспрессию в клетке. Такое использование кодонов будет зависеть от выбранного типа клеток. Паттерны использования специализированных кодонов были разработаны для *E. coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, клеток растений, клеток дрожжей и клеток насекомых. Смотрите, например: Mayfield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., *Protein Expr. Purif.*, 26(1):96-105 (October 2002); Connell, N.D., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12(5):446-449 (October 2001); Makrides et al., *Microbiol. Rev.*, 60(3):512-538 (September 1996) и Sharp et al., *Yeast*, 7(7):657-678 (October 1991).

Общие техники для манипуляции с нуклеиновыми кислотами описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) или Ausubel, F. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) и периодических обновлениях, включенных в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, ДНК, кодирующая полипептид, функционально связана с подходящими регуляторными элементами транскрипции или трансляции, полученными из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают в себя промотор транскрипции, необязательную последовательность оператора для управления транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящий рибосомальный сайт связывания мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Способность к репликации в хозяине, как правило, предоставляемая сайтом инициации репликации, и ген селекции для облегчения распознавания трансформантов включены дополнительно.

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

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

Для дрожжевой секреции нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, дрожжевым инвертазным лидером, лидером фактора (включая в себя лидеры альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидером-кислотной фосфатазой, лидером-глюкоамилазой *C. Albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в патенте США № 5631144. В клеточной экспрессии млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD простого герпеса. ДНК для таких областей-предшественников может быть лигирована в рамку считывания с ДНК, кодирующей белок. Векторы как экспрессии, так и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в векторах клонирования эта последовательность представляет собой ту, которая дает возможность вектору реплицировать независимо хромосомную ДНК хозяина, и включает в себя точку ориджина или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, ориджин плазмиды размером 2 мкм подходит для дрожжей, и различные вирусные ориджины (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Вообще, ориджин компонента репликации не нужен для экспрессирующих векторов млекопитающих (ориджин SV40 можно, как правило, использовать только потому, что он содержит ранний промотор).

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

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок согласно настоящему изобретению, например, основанный на фибронектине каркасный белок. Промоторы, при-

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

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в хозяевах-дрожжах включают в себя промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа. Транскрипцию из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих можно регулировать, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовирус (такой как аденовирус 2), бычий вирус папилломы, птичий вирус саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Транскрипция ДНК, кодирующей белок согласно настоящему изобретению, более высокими эукариотами часто увеличивается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, а-фетопротеин и инсулин). Как правило, однако, используют один энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают в себя энхансер SV40 на поздней стороне сайта инициации репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне сайта инициации репликации и аденовирусные энхансеры. Смотрите также Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) об усиливающих элементах для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть встроен в вектор в положении 5' или 3' к кодирующей пептид последовательности, но предпочтительно расположен в сайте 5' от промотора. Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядерных клетках от других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5' и, иногда, 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей белок согласно настоящему изобретению. Один из применимых компонентов терминации транскрипции представляет собой область полиаденилирования бычьего гормона роста. Смотрите WO 94/11026 и раскрытый в нем экспрессирующий вектор.

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

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

Подходящие клетки-хозяева включают в себя прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают в себя грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E.coli* или *Bacillus* spp. Дрожжи, предпочтительно видов *Saccharomyces*, такие как *S.cerevisiae*, могут также быть использованы для производства полипептидов. Различные системы клеточных культур млекопитающих или насекомых могут быть также использованы для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для производства гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются в Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Примеры подходящих ли-



ний клеток-хозяев млекопитающих включают в себя клеточные линии эндотелиальных клеток, клеток почек обезьяны COS-7, CV-1, L клеток, C127, 3T3, клеток яичника китайского хомячка (СНО), клеток почек эмбриона человека, HeLa, 293, 293Т и ВНК. Очищенные полипептиды получают путем культивирования подходящих систем хозяин/вектор для экспрессии рекомбинантных белков. Для многих применений небольшой размер многих описанных в настоящем документе полипептидов сделал бы экспрессию в *E. coli* предпочтительным способом для экспрессии. Затем белок очищают от культуральной среды или клеточных экстрактов.

## VI. Производство белка

Настоящее изобретение также направлено на клеточные линии, которые экспрессируют антимио-статинный аднектин или его слитый полипептид. Создание и выделение клеточных линий, продуцирующих антимиостатинный аднектин, может быть осуществлено с использованием стандартных техник, известных в настоящей области техники, такие как те, что описаны в настоящем документе. Клетки-хозяева трансформируют с описанными в настоящем документе экспрессирующими или клонирующими векторами для производства белка и культивирования в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности. В показанных в настоящем документе примерах клетки-хозяева, используемые для высокоэффективного производства белка (НТТР) и производства средней эффективности, были из бактериального штамма HMS174.

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

Клетки-хозяева, используемые для получения белков согласно настоящему изобретению можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная эссенциальная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM), (Sigma)), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, многие из сред, описанные в Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barries et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), патенты США № 4767704, 4657866, 4927762, 4560655, 5122469, 6048728, 5672502 или патент США № RE 30985, могут быть использованы в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть дополнена при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (например, лекарственным средством гентамицином), микроэлементами (определенными как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в настоящей области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой те, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в настоящей области.

Описанные в настоящем документе белки могут также быть получены с использованием системы трансляции клетки. Для этих целей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, должны быть модифицированы, чтобы позволить транскрипцию *in vitro* для получения мРНК и позволить бесклеточную трансляцию мРНК в определенной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная система трансляции млекопитающих или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная система трансляции). Белки согласно настоящему изобретению могут быть также получены путем химического синтеза (например, с помощью способов, описанных в Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Модификации белка также могут быть получены с помощью химического синтеза. Белки согласно настоящему изобретению могут быть очищены с помощью способов выделения/очистки для белков, как правило, известных в области химии белков. Неограничивающие примеры включают в себя экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, с сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, гель фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки полипептиды могут быть обменены на различные буферы и/или сконцентрированы с помощью любого из разнообразных способов, известных в настоящей области техники, включающих в себя без ограничения фильтрование и диализ. Очищенный полипептид представляет собой предпочтительно очищенный по меньшей мере на 85% или предпочтительно по меньшей мере на 95%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98%. Независимо от точного числового значения чистоты полипептид представляет собой достаточно чистый для использования в качестве фармацевтического продукта.

## **VII. Биофизическая и биохимическая характеристика**

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

Анализы аффинности связывания *in vitro*.

Антимиостатиновые аднектины, которые связываются с и противодействуют миостатину, могут быть определены с использованием различных анализов *in vitro*. Предпочтительно, анализы представляют собой высокоэффективные анализы, которые делают возможным скрининг нескольких кандидатных аднектинов одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления BMP-11, который разделяет 90% аминокислотной идентичности с миостатином, может быть использован в качестве суррогата миостатина в анализах *in vitro*, когда анализ проводят в насыщающих условиях. Примечательно, что слитые с доменами Fc антимиостатиновые аднектины могут связываться как с миостатином, так и BMP-11, в то время как моноаднектины связываются преимущественно с миостатином. Без ограничения какой-либо теорией это может отражать повышенную avidность двухвалентных слитых с Fc аднектинов, по сравнению с моновалентными аднектинами. Подобное усиленное связывание с BMP11 наблюдается с двухвалентными пегилированными аднектинами, например, АТІ-1341, которые содержат аднектины, слитые с двух концов с фрагментами ПЭГ 20 кД. Иллюстративные анализы для определения аффинности связывания антимиостатиновых аднектинов описаны в примерах ниже и включают в себя без ограничения жидкофазные способы, такие как анализ кинетического исключения (KinExA) (Blake et al., JBC 1996; 271:27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328:35-43), поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с системой Biacore (Uppsala, Sweden) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton and Myszk, Methods in Enzymology 1998; 295:268) и анализы гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Newton et al., J Biomol Screen 2008; 13:674-82; Patel et al., Assay Drug Dev Technol 2008; 6:55-68).

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обладают IC50 в анализе HTRF, описанном в примере 4, равной 5 нМ или менее, 4 нМ или менее, 3 нМ или менее, 2,5 нМ или менее, 2 нМ или менее, 1,5 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,5 нМ или менее, 0,2 нМ или менее или 0,1 нМ или менее. Предпочтительно, IC50 составляет 1,5 нМ или менее. Более предпочтительно, IC50 составляет 0,5 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению обладают  $K_D$  в анализе кинетического исключения, описанном в примере 7, равной 2 нМ или менее, 1,5 нМ или менее, 1 нМ или менее, 900 пМ или менее, 850 пМ или менее, 800 пМ или менее, 750 пМ или менее, 700 пМ или менее, 650 пМ или менее, 600 пМ или менее, 550 пМ или менее, 500 пМ или менее, 450 пМ или менее, 400 пМ или менее, 350 пМ или менее, 340 пМ или менее, 330 пМ или менее, 300 пМ или менее, 250 пМ или менее, 200 пМ или менее, 150 пМ или менее или 100 пМ или менее. Предпочтительно,  $K_D$  составляет 850 пМ или менее.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе выше анализы представляют собой иллюстративные и что любой известный в настоящей области техники способ определения аффинности

связывания между белками (например, основанный на переносе флуоресценции (FRET), иммуноферментный анализ, а также анализы конкурентного связывания (например, радиоиммуноанализы)) может быть использован для оценки аффинности связывания антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению.

Анализы на активность антагониста *in vitro*.

Способность антимиостатиновых аднектинов противодействовать активности миостатина может быть легко определена с использованием различных анализов *in vitro*. Предпочтительно, анализы представляют собой высокоэффективные анализы, которые позволяют скрининг нескольких кандидатных аднектинов одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления антагонистические эффекты антимиостатиновых аднектинов на миостатиновую активность могут быть определены в основанных на клетках реагирующих на активин элемент (ARE) -люциферазных репортерных анализах, как описано в примере 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению снижают индуцированную миостатином активность ARE-люциферазы по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более по отношению к контролю при совместной инкубации миостатина с антимиостатиновым аднектином до стимуляции клеток со смесью. Иллюстративная контрольная реакция включает в себя обработку клеток только миостатином или миостатином, предварительно инкубированным с избытком эталонного ингибитора миостатина, таким как химера активина RIIb Fc человека (R&D Systems) или ActRIIb-Fc, как описано в Morrison et al. (Experimental Neurology 2009; 217:258-68). Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют репортерную активность ARE-люциферазы с IC<sub>50</sub> равной 500 nM или менее, 400 nM или менее, 300 nM или менее, 200 nM или менее, 100 nM или менее, 50 nM или менее, 10 nM или менее, 5 nM или менее, 1 nM, 0,5 nM или менее, 0,4 nM или менее, 0,3 nM или менее, 0,2 nM или менее или 0,1 nM или менее, как описано в примере 3.

Согласно другим вариантам осуществления антагонистические эффекты антимиостатиновых аднектинов на миостатиновую активность могут быть определены путем измерения степени фосфорилирования SMAD в обработанных миостатином клетках, как описано в примере 5. Согласно определенным вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению уменьшают индуцированное миостатином фосфорилирование SMAD по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 97% или более по отношению к контролю при совместной инкубации миостатина с антимиостатиновым аднектином до стимуляции клеток со смесью. Иллюстративная контрольная реакция включает в себя обработку клеток только с миостатином или миостатином, предварительно инкубированным с избытком эталонного ингибитора миостатина, таким как химера активина RIIb Fc человека (R&D Systems) или ActRIIb-Fc, как описано в Morrison et al. (Experimental Neurology 2009; 217:258-68). Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению ингибируют фосфорилирование SMAD с IC<sub>50</sub> равной 1 nM или менее, 0,8 nM или менее, 0,6 nM или менее, 0,4 nM или менее, 0,3 nM или менее, 0,2 nM или менее, 0,1 nM или менее в 12-балльной или 4-балльной реакции ингибирования, как описано в примере 5. Согласно другим вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению при 10 nM ингибируют фосфорилирование SMAD миостатином по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 98% или более, как описано в примере 5.

Кроме того, известно несколько модельных систем *in vitro*, которые используют клетки, культуры тканей и гистологические способы для исследования заболеваний моторных нейронов. Например, органотипический срез спинного мозга крыс, подвергнутый глутаматной эксайтотоксичности, применим в качестве модельной системы для проверки эффективности антимиостатиновых аднектинов в предотвращении дегенерации двигательных нейронов. Corse et al., Neurobiol. Dis. (1999) 6:335-346. Для обсуждения систем *in vitro* для использования в исследовании ALS см., например, Bar, P. R., Eur. J. Pharmacol. (2000) 405:285-295; Silani et al., J. Neurol. (2000) 247 Suppl 1:128-36; Martin et al., Int. J. Mol. Med. (2000) 5:3-13. Следует понимать, что описанные в настоящем документе анализы представляют собой иллюстративные и что любой известный в настоящей области техники способ, который может служить в качестве отсчета для миостатиновой активности, представляет собой подходящий для использования в исследовании миостатиновых антагонистических эффектов антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению (например, ПЦР в режиме реального времени мРНК генов-мишеней SMAD (например, Smad 7; Ciarmela et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2011; 96: 755-65) или мРНК ARE-содержащих генов).

Модели *in vivo*.

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

Например, не ограничивающие примеры таких животных моделей включают в себя, например, мышиную модель с X-хромосомной мышечной дистрофией (mdx) (US 2011/0008375, Gehrig et al., *Nature* 2012; 484:394-8), включая в себя 4 дополнительных штамма мыши mdx - мышь mdx2cv, mdx3cv, mdx4cv, or mdx5cv (Phelps et al., *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(8):1149-1153), мышь mdx с дополнительной абляцией дистрофинового гомолога атрофина (mdx/utr<sup>-/-</sup>) (Deconinck et al., *Cell*. 1997; 90(4):717-727), альфа-SG-нулевая C57BL/6 мышь (Duclos et al. (1998) *J. Cell Biol.* 142, 1461-1471), и те, которые недавно рассмотрены в Nakamura et al., (*J Biomed Biotechnol.* 2011; Article ID No: 184393), например, мышь mdx52, в которой удаляется экзон 52 мышинового гена DMD, модель мышечной дистрофии Golden Retriever (GRMD), модель X-хромосомной мышечной дистрофии собак (CXMDJ) и модель гипертрофической кошачьей мышечной дистрофии (HFMD) (например, Shelton et al., *Neuromuscular Disorders*. 2005; 15(2): 127-138).

Животные модели для изучения нарушений мотонейронов, таких как ALS, представляют собой трансгенных мышей с ALS-связанным мутантным геном Cu/Zn супероксиддисмутазы (SOD1) (mSOD1G93A и/или mSOD1G37R). Эти мыши развивают доминантно наследуемое паралитическое нарушение во взрослом возрасте со многими клиническими и патологическими особенностями семейного ALS. (Например, Gurney et al., *Science* (1994) 264:1772 1775; Nagano et al., *Life Sci* (2002) 72:541 548). Другие животные модели включают в себя две встречающиеся в природе мышинные модели для прогрессивной двигательной нейропатии (pmn) и нестабильности шейного отдела позвоночника (воблер-синдром) (Haeggeli and Kato, *Neurosci. Lett.* (2002) 335:39 43). Для обзора различных животных моделей для использования в изучении мотонейронных заболеваний, таких как ALS, см., например, Jankowsky et al., *Curr Neurol Neurosci. Rep.* (2002) 2:457 464; Elliott, J. L., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6:310 20; and Borchelt et al., *Brain Pathol.* (1998) 8:735 757. Животные модели других нейродегенеративных или нейропатологических заболеваний в дополнение к ALS включают в себя модели трансгенных мышей для оценки спинной и бульбарной мышечной атрофии (SBMA) (Katsuno et al., *Neuron* (2002) 35:843 854), животные модели для паралитического полиомиелита человека (Ford et al., *Microb. Pathog.* (2002) 33:97 107), животные модели спинальной мышечной атрофии (Schmid et al., *J. Child Neurol.* 22, 1004-1012, 2007), животные модели для дистальной миопатии и наследственной миопатии с включениями (Malicdan et al., *Acta Myol.* 2007 December; 26(3): 171-175), мышинной модели генетического демиелинизирующего заболевания (Suzuki et al., *Microsc. Res. Tech.* 1995; 32:204-214) и те, которые описаны в Meyer ZuHörste et al. (*Curr. Opin. Neurol.* 2006; 19:464-473). Животные модели для исследования эффективности антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению по отношению к потере мышечного объема вследствие атрофии и/или бездействия, включают в себя без ограничения мышинные модели односторонней иммобилизации (Madaro et al., *Basic Applied Myology* 2008; 18:149-153), разрыва ахиллового сухожилия (тенотомия) (Bialek et al., *Physiol Genomics* 2011; 43:1075-86) и те, которые раскрыты в Powers et al. (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R337-44), такие как, подвешивание задних конечностей животных, иммобилизация лимба и контролируемая искусственной вентиляции легких.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению в увеличении мышечной массы или объема может быть исследована с помощью подкожной инъекции мышам, как описано в примере 9. Учитывая, что ингибирование миоста-

тина увеличивает мышечную массу, ожидается, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению будут увеличивать массу тела и мышечную массу в степени, которую можно использовать для определения активности аднектинов.

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

### **VIII. Терапевтические применения**

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрены антимиостатиновые аднектины, применимые для лечения связанного с миостатином заболевания или нарушений, например, нарушений, связанных с мышечной слабостью, мышечной атрофией, нарушений обмена веществ, а также дегенеративных заболеваний костей. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение эффективного количества связывающего миостатин полипептида, т.е. антимиостатинового аднектина, субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины представляют собой фармацевтически приемлемые для млекопитающего, в частности, человека. Термин "фармацевтически приемлемый" полипептид относится к полипептиду, который вводят в организм животного без значительных побочных медицинских последствий, таких, как по существу без эндотоксинов или с очень низким содержанием эндотоксинов. Согласно некоторым вариантам осуществления антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту в комбинации (одновременно или по отдельности) со средством, известным в настоящей области техники как полезное при конкретном нарушении или заболевании, которое подвергают лечению.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов-мишеней для терапии с антимиостатиновым аднектином представляет собой ту, у которой не поддается стандартной терапии заболевание, нарушение или состояние, которое лечат из-за, например, возраста, уже существующих условий, генетического строения и/или сопутствующих заболеваний. Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут служить в качестве альтернативы для существующих способов лечения, которые связаны со значительными побочными эффектами (например, на репродуктивную функцию) или из соображений безопасности.

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

**Мышечные, неврологические и метаболические заболевания и нарушения.**

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

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

Например, антимиостатиновые аднектины могут быть использованы для лечения унаследованных миопатий и нервно-мышечных нарушений (например, мышечной дистрофии (Gonzalez-Kadavid et al., PNAS, 1998; 95:14938-43), нарушений двигательных нейронов, врожденных миопатий, воспалительных миопатий и метаболических миопатий), а также приобретенных миопатий (например, индуцированной лекарственными средствами миопатии, индуцированной токсинами миопатии, индуцированной инфекцией миопатии, паранеопластической миопатии и других миопатий, связанных с критическими заболе-

ваниями).

Такие нарушения включают в себя без ограничения мышечную дистрофию Дюшенна, прогрессирующую мышечную дистрофию, мышечную дистрофию типа Беккера, мышечную дистрофию Дежерин-Ландузи, мышечную дистрофию Эрба, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, тазово-поясную мышечную дистрофию, окулофарингеальную мышечную дистрофию (OPMD), плече-лопаточно-лицевую миопатию, врожденную мышечную дистрофию, детскую нейроаксональную мышечную дистрофию, миотоническую дистрофию (заболевание Штейнберга), дистальную мышечную дистрофию, немалиновую миопатию, семейный периодический паралич, недистрофическую миотонию, периодические параличи, спинальную мышечную атрофию (SMA), боковой амиотрофический склероз (ALS), первичный боковой склероз (PLS), прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), дистальную миопатию, миотубулярную/цетронуклеарную миопатию, немалиновую миопатию, заболевание малых стержней, заболевание центрального стержня, десминопатию, миозит с включенными тельцами, дерматомиозит, полимиозит, митохондриальную миопатию, врожденный миастенический синдром, миастению, постполиомиелитную дисфункцию мышц, стероидную миопатию, алкогольную миопатию, перооперационную мышечную атрофию и нейромиопатию ICU. Наследственные и приобретенные нейропатии и радикулопатии, которые можно лечить с помощью антимиостатиновых аднектинов включают в себя без ограничения ригидный синдром позвоночника, мышечно-глазо-мозговое заболевание, наследственную двигательную и сенсорную нейропатию, заболевание Шарко-Маритута, хроническую воспалительную нейропатию, прогрессирующую гипертрофическую нейропатию, нейропатию со склонностью к параличам от сдавливания, волчанку, синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, рассеянный склероз, саркоидоз, диабетическую нейропатию, алкогольную нейропатию, связанные с заболеваниями нейропатии (например, ВИЧ/СПИД, болезнь Лайма), связанные с токсинами нейропатии (например, тяжелыми металлами, химиотерапией), компрессионную нейропатию (например, опухоли, нейропатия сдавливания) и нейропатии, связанные с повреждением или травмой (например, синдром конского хвоста, паралич, тетрапаралич).

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

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

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

Кроме того, связанное с возрастом увеличение соотношения жира к мышцам и связанная с возрастом мышечная атрофия, по всей видимости, связана с миостатином. Например, средний сывороточный миостатин-иммунореактивный белок увеличивается с возрастом в группах молодых (19-35 лет), среднего возраста (36-75 лет) и пожилых (76-92 лет) мужчин и женщин, в то время как средняя мышечная масса и масса без жира снижалась с возрастом в этих группах (Yarasheski et al. *J Nutr Aging* 6(5):343-8 (2002)). Соответственно, субъекты с мышечной атрофией в результате старения и/или субъекты, которые слабые в результате, например, саркопении, также будут получать пользу от лечения с антимиостатиновыми аднектинами согласно настоящему изобретению.

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

Эффективность антимиостатинового аднектина при лечении связанных со слабостью мышц или атрофией мышц нарушений может быть определена, например, с помощью одного или нескольких способов измерения увеличения мышечной массы или объема, увеличения числа мышечных клеток (гиперпла-

зии), увеличения размеров мышечной клетки (гипертрофии) и/или повышения мышечной силы. Например, эффекты увеличения объема мышц антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению показаны в примерах, описанных ниже. Способы определения "увеличенной мышечной массы" хорошо известны в настоящей области техники. Например, содержание мышц может быть измерено до и после введения антимиостатинового аднектина согласно настоящему изобретению с использованием стандартных способов, таких как подводное взвешивание (см., например, Bhasin et al. *New Eng. J. Med.* (1996) 335:1-7) и двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (см., например, Bhasin et al. *Mol. Endocrinol.* (1998) 83:3155-3162). Увеличение размеров мышц может быть доказано увеличением веса по меньшей мере приблизительно на 5-10%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 10-20% и более.

Нарушения обмена веществ.

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

Миостатин участвует в патогенезе сахарного диабета типа II. Миостатин экспрессируется в жировой ткани и дефицитные по миостатину мыши проявляют сниженное накопление жира, когда они стареют. Кроме того, глюкозная нагрузка, накопление жира и общая масса тела уменьшаются у не содержащих миостатин агутти (летальных желтых) мышей с ожирением (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) (Yen et al., *FASEB J.* 8:479, 1994; McPhetron et al., 2002). Как описано в US 2011/0008375, миостатиновые антагонисты могут уменьшать соотношение жира к мышцам в возрастной мышшиной модели, сохранять массу скелетных мышц и сухую массу тела и ослаблять гипертрофию почек у индуцированных STZ диабетических мышей.

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

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

Термин "сахарный диабет типа II" относится к хроническому, продолжающемуся в течение всей жизни заболеванию, которое возникает, когда инсулин в организме не может эффективно работать. Основной компонент сахарного диабета типа II представляет собой "резистентность к инсулину", при которой инсулин, вырабатываемый поджелудочной железой, не может соединиться с жировыми и мышечными клетками, чтобы позволить глюкозе попасть внутрь для производства энергии, в результате чего возникает гипергликемия (высокий уровень глюкозы в крови). Чтобы компенсировать это, поджелудочная железа вырабатывает больше инсулина, а клетки, чувствуя это наводнение инсулином, становятся еще более устойчивыми, приводя к порочному кругу высокого содержания глюкозы и частому высокому содержанию инсулина.

Используемая в настоящем документе фраза "связанные с сахарным диабетом нарушения" или "нарушения, связанные с сахарным диабетом", или "относящиеся к сахарному диабету нарушения" относится к состояниям и другим заболеваниям, которые обычно связаны с или относятся к сахарному диабету. Примеры нарушений, связанных с сахарным диабетом, включают в себя, например, гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию, инсулинорезистентность, нарушенный метаболизм глюкозы, ожирение, диабетическую ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, катаракту, диабетическую нефропатию, гломерулосклероз, диабетическую нейропатию, эректильную дисфункцию, предменструальный синдром, рестеноз сосудов, язвенный колит, ишемическое заболевание сердца, гипертоническое заболевание, стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, нарушения кожи и соединительной ткани, язвы ног, метаболический ацидоз, артрит и остеопороз. Эффективность антимиостатиновых аднектинов в лечении метаболических нарушений может быть определена, например, с помощью одного или нескольких способов измерения увеличения чувствительности к инсулину, увеличения захвата глюкозы клетками от

субъекта, снижения содержания глюкозы в крови, а также уменьшения жира в организме.

Например, у субъектов с сахарным диабетом типа II или у тех, которые подвержены риску развития сахарного диабета, могут контролироваться уровни HbA1c. Используемый в настоящем документе термин "гемоглобин 1AC" или "HbA1c" относится к продукту неферментативного гликирования цепи гемоглобина В. Желаемый диапазон-мишень уровней HbA1c для людей с сахарным диабетом может быть определен из руководства Американской диабетической ассоциации (ADA), т.е. стандартов медицинской помощи при диабете (Diabetes Care 2012; 35(Suppl 1):S511-563). Текущие уровни HbA1c, как правило, <7,0% для людей с сахарным диабетом, а люди, которые не страдают от сахарного диабета, как правило, характеризуются значениями HbA1c менее чем 6%. Соответственно, эффективность антимиостатиновых аднектинов согласно настоящему изобретению может быть определена с помощью наблюдаемого снижения уровня HbA1c у субъекта. Способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают введение антимиостатинового аднектина отдельно или в комбинации с другими средствами, которые известны в настоящей области техники для гликемического контроля (например, инсулин, GLP1) или для лечения известных в настоящей области техники связанных с диабетом осложнений.

Другие нарушения.

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

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

Комбинированные способы лечения.

Предусмотренные в настоящем документе антимиостатиновые аднектины могут быть использованы в сочетании с противодиабетическими средствами, противогипергликемическими средствами, противогиперинсулинемическими средствами, противоретинопатическими средствами, противоневропатическими средствами, противонейродегенеративными средствами, противонефропатическими средствами, противоатеросклеротическими средствами, противоишемическими средствами, противогипертензивными средствами, средствами против ожирения, противодислипидемическими средствами, противогиперлипидемическими средствами, противогипертриглицеридемическими средствами, противогиперхолестеринемическими средствами, противорестенозическими средствами, противопанкреатическими средствами, гиполипидемическими средствами, средствами анорексии, улучшающими память средствами, средствами против деменции или способствующими когнитивной функции средствами, супрессантами аппетита, нейро- или опорновосстановительными процедурами, лечением сердечной недостаточности, лечением заболеваний периферических артерий и противовоспалительными средствами.

Противодиабетические средства, используемые в сочетании с антимиостатиновыми аднектинами, включают в себя без ограничения стимуляторы секреции инсулина или сенситизаторы инсулина, модуляторы рецептора GPR40 или другие противодиабетические средства. Эти средства включают в себя без ограничения ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DP4) (например, ситаглиптин, саксаглиптин, алоглиптин, вилдаглиптин и т.п.), бигуаниды (например, метформин, фенформин и т.п.), сульфонилмочевины (например, глибурид, глимепирид, глипизид и т.п.), ингибиторы глюкозидазы (например, акарбозу, миглитол и т.п.), агонисты PPAR $\gamma$ , такие как тиазолидиндионы (например, розиглитазон, пиоглитазон и т.п.), двойные агонисты PPAR- $\alpha/\gamma$  (например, мураглитазар, тезаглитазар, алеглитазар и т.п.), активаторы глюкокиназы (как описано в Fyfe et al., *Drugs of the Future*, 34(8):641-653 (2009) и включено в настоящий документ посредством ссылки), модуляторы рецептора GPR119 (MBX-2952, PSN821, APD597 и т.п.), ингибиторы SGLT2 (дапаглифлозин, канаглифлозин, ремаглифлозин и т.п.), аналоги амилина, такие как прамлинтид и/или инсулин. Обзоры о текущих и новых способах лечения сахарного диабета могут быть найдены в: Mohler et al., *Medicinal Research Reviews*, 29(1): 125-195 (2009) и Mizuno et al., *Current Medicinal Chemistry*, 15:61-74 (2008). Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут также быть необязательно использованы в сочетании с одним или несколькими гипофагическими средствами, такими как диэтилпропион, фендиметразин, фентермин, сибутрамин, орлистат, лорказерин, прамлинтид, топирамат, антагонисты рецепторов MCHR1, оксинтомодулин, налтрексон, амилинпептид, модуляторы рецепторов NPY Y5, модуляторы рецепторов NPY Y2, модуляторы рецепторов NPY Y4, цетилистат, модуляторы рецепторов 5HT2c и тому подобное. Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть также использованы в сочетании с агонистом рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1 R), таким как экзенатид, лираглутид, GPR-1(1-36) амид, GLP-1(7-36) амид, GLP-1(7-37) (как описано в патенте США № 5614492 на Habener, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки), которые могут быть введены с помощью инъекции, интраназально или с помощью трансдермальных или буккальных устройств. Обзоры текущих и новых способов



лечения ожирения могут быть найдены в: Melnikova et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 5:369-370 (2006); Jones, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 8:833-834 (2009); Obici, *Endocrinology*, 150(6):2512-2517 (2009) и Elangbam, *Vet. Pathol.*, 46(1): 10-24 (2009).

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

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть введены с одним или несколькими дополнительными средствами, используемыми в симптоматической терапии. Не ограничивающие примеры таких средств для лечения симптомов ALS включают в себя активаторы митохондриальных пор переходной проницаемости (MPT), активаторы тропонина быстрых скелетных мышц, регуляторы макрофагов (например, NP001), средства лечения лизосомального заболевания накопления (например, NP003) и антагонисты никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR). Не ограничивающий пример дополнительного средства для использования в лечении симптомов DMD/BMD представляет собой средство, которое повышает содержание АТФ.

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

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

#### IX. Фармацевтические композиции

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

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть в форме пилюли, таблетки, капсулы, жидкости или таблетки с замедленным высвобождением для перорального введения; жидкости для внутривенного, подкожного или парентерального введения; или геля, лосьона, мази, крема или полимера или другого носителя с замедленным высвобождением для местного введения. Хорошо известные в настоящей области техники способы для получения композиций можно найти, например, в "Remington: The

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

Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы представляют собой нетоксичные для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включающие в себя аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие в себя глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-протеиновые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

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

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулу, полученную, например, с помощью техник коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозная или желатиновая микрокапсула и поли(метилметакрилатная) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие техники описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие белки согласно настоящему изобретению, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают в себя сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилата) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксibuтировую кислоту. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота способны высвобождать молекулы в течение более чем 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные белки согласно настоящему изобретению могут оставаться в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружен механизм агрегации, приводящий к образованию межмолекулярной S-S связи через тио-дисульфидный обмен, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контролирования содержания влаги, использования соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

Композиции согласно настоящему изобретению для перорального применения включают в себя таблетки, содержащие активный ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу и сорбит), смазочные средства, скользящие вещества и антиадгезивы (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк). Композиции для перорального применения могут быть также предусмотрены в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водой или масляной средой.

Фармацевтическая композиция для использования для введения *in vivo*, как правило, должны быть стерильной. Это может быть достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Когда композицию лиофилизируют, стерилизация с использованием этого способа может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиция для парентерального введения может быть сохранена в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, содержащий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора, содержащий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции. После того, как фармацевтическая композиция составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в виде готовой к употреблению формы, либо в форме (например, лиофилизированной), требующей воссоздания перед введением.

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

#### **X. Введение**

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

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

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

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

Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров связывания молекулы-средства в используемом составе. Как правило, композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута

дозировка, которая позволяет достичь желаемого эффекта. Таким образом, композиция может быть введена в виде разовой дозы или в виде нескольких доз (в той же или разных концентрациях/дозах) с течением времени, или в виде непрерывной инфузии. Обычно осуществляют дополнительное совершенствование соответствующей дозировки. Соответствующие дозы могут быть определены с помощью использования соответствующих данных доза-ответ. Например, антимиостатиновый аднектин может быть вводиться ежедневно (например, один раз, два раза, три раза или четыре раза в день) или реже (например, один раз в день, раз или два раза в неделю или раз в месяц). Кроме того, как известно в настоящей области техники, могут быть необходимы корректировки по возрасту, а также весу тела, общему состоянию здоровья, полу, диеты, времени введения, взаимодействия лекарственных средств, а также тяжести заболевания, и будут поддаваться определению с помощью обычных экспериментов специалистами в настоящей области техники. Антимиостатиновый аднектин соответствующим образом вводят пациенту одновременно или в виде серии введений. Введение антимиостатинового аднектина или его слияния и одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, вводимых совместно или последовательно, может происходить, как описано выше для терапевтических применений. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и вспомогательные вещества для совместного введения будут зависеть от идентичности конкретного вводимого терапевтического средства.

#### **XI. Способы обнаружения и диагностики**

Антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению могут быть также использованы в различных диагностических применениях. Например, антимиостатиновый аднектин согласно настоящему изобретению может быть использован для диагностики нарушения или заболевания, связанного с повышенным содержанием миостатина. Аналогичным образом, антимиостатиновый аднектин может быть использован в анализе для контроля содержания миостатина у субъекта, подвергающегося лечению от связанного с миостатином состояния. Антимиостатиновые аднектины могут быть использованы с или без модификации и помечены путем ковалентного или нековалентного прикрепления детектируемого фрагмента. Детектируемый фрагмент может представлять собой любой, который способен производить, прямо или косвенно, обнаруживаемый сигнал. Например, детектируемым фрагментом может быть радиоизотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  или  $^{13}\text{P}$ ,  $^{32}\text{S}$  или  $^{113}\text{I}$ ; флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена.

Может быть использован любой известный в настоящей области техники способ для конъюгации белка с детектируемым фрагментом, включая в себя способы, описанные в Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981) и Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982). Способы *in vitro* включают в себя химию конъюгации, хорошо известную в настоящей области техники, включая в себя химию, совместимую с белками, такую как химия конкретных аминокислот, таких как Cys и Lys. Для того чтобы связать фрагмент (такой как, ПЭГ) с белком согласно настоящему изобретению, используется связывающая группа или реакционноспособная группа. Подходящие связывающие группы хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислоталабильные группы, фотоллабильные группы, пептидазоллабильные группы и эстеразоллабильные группы. Предпочтительные связывающие группы представляют собой дисульфидные группы и тиоэфирные группы в зависимости от применения. Для полипептидов без аминокислоты Cys, Cys может быть сконструирован в локации, чтобы позволить активности протеина существовать при создании локации для конъюгации. Антимиостатиновые аднектины, связанные с детектируемым фрагментом, также применимы для визуализации *in vivo*. Полипептид может быть связан с рентгеноконтрастным средством или радиоизотопом, вводимым субъекту, предпочтительно в кровоток, и у субъекта анализируют присутствие и расположение меченого белка. Эта техника визуализации применима в постановке и лечении злокачественных опухолей. Белок может быть помечен любым фрагментом, который обнаруживается у субъекта либо ядерным магнитным резонансом, радиологией, либо другим средством обнаружения, известным в настоящей области техники. Антимиостатиновые аднектины также применимы в качестве аффинных средств очистки. В этом процессе полипептиды иммобилизуют на подходящей подложке, такой как смола Sephadex или фильтровальная бумага, с использованием способов, хорошо известные в настоящей области техники.

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

Согласно некоторым аспектам в настоящем изобретении предусмотрены способы обнаружения молекулы-мишени в образце. Способ может включать контактирование образца с описанными в настоящем документе антимиостатиновыми аднектинами, причем указанное контактирование осуществляется в условиях, которые позволяют образование комплекса антимиостатиновый аднектин-мишень; и обнаружение указанного комплекса, тем самым обнаруживая указанную мишень в указанном образце. Обнаружение можно проводить с использованием любой известной в настоящей области техники технологии, такой как, например, радиография, иммунологический анализ, обнаружение флуоресценцией, масс-

спектрометрия или поверхностный плазмонный резонанс. Образец может быть от человека или другого млекопитающего. Антимюстатинные аднектины могут быть помечены метящим фрагментом, таким как радиоактивный фрагмент, флуоресцентный фрагмент, хромогенный фрагмент, хемилюминесцентный фрагмент или гаптенный фрагмент. Антимюстатинные аднектины могут быть иммобилизованы на твердой подложке.

## **XII. Наборы и промышленные изделия**

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

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

Включение путем ссылки.

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

## **Примеры**

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

Пример 1 - производство белка.

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

Клеточные осадки (в 24-луночном формате) лизировали путем ресуспендирования в 450 мкл лизирующего буфера (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 1-кратный коктейль ингибитора протеазы Complete™ без ЭДТА (Roche), 1 mM PMSF, 10 mM CHAPS, 40 mM имидазол, 1 мг/мл лизоцима, 30 мкг/мл ДНКазы, 2 мкг/мл апротонина, pH 8,0) и встряхивали при комнатной температуре в течение 1-3 ч. Лизаты очищали и заново сливали в 96-луночный формат путем переноса в 96-луночный Whatman GF/D Unifilter, оснащенный 96-луночным планшетом захвата с объемом 1,2 мл, и фильтровали с помощью положительного давления. Очищенные лизаты переносили в 96-луночный никель или кобальт-хелатирующий планшет, который был уравновешен с уравновешивающим буфером (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 40 mM имидазол, pH 8,0) и инкубировали в течение 5 мин. Несвязанный материал удаляли с помощью положительного давления. Смолу дважды промывали с промывочным буфером #1 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 5 mM CHAPS, 40 mM имидазол, pH 8,0) в объеме 0,3 мл/лунку. Каждое отмывание удаляли положительным давлением. Перед элюированием каждую лунку промывали с 50 мкл элюирующего буфера (PBS+20 mM ЭДТА), инкубировали в течение 5 мин и это отмывание сливали с помощью положительного давления. Белок элюировали путем применения дополнительных 100 мкл элюирующего буфера в каждую лунку. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре планшет(ы) центрифугировали в течение 5 мин при 200 g и элюированный белок собирали в 96-луночных планшетах для улавливания, содержащих 5 мкл 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, добавленного на дно планшета для улавливания до элюирования. Элюированный белок количественно определяли с использованием анализа общего белка с доменом <sup>10</sup>Fn3 дикого типа в

качестве белкового стандарта. Экспрессия и очистка нерастворимых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих

Для экспрессии выбранный клон(ы) с последующей меткой HIS<sub>6</sub>tag, клонировали в вектор pET9d и экспрессировали в клетках BL21 DE3 plysS E.coli. Двадцать мл инокулята культуры (полученного из одной высеянной колонии) использовали для инокуляции 1 л среды LB или сред TB-Overnight Expression (автоиндукция), содержащей 50 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры в среде LB инкубировали при 37°C до A600 0,6-1,0, после чего на них воздействовали 1 mM изопропил-β-тиогалактозидом (IPTG) и культивировали в течение 4 ч при 30°C. Культуры, выращенные в средах TB-Overnight Expression, инкубировали при 37°C в течение 5 ч, после чего температуру снижали до 18°C и выращивали в течение 19 ч. Культуры собирали центрифугированием в течение 30 мин при ≥10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. После оттаивания клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл буфера для лизиса (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 1-кратный коктейль протеазных ингибиторов Complete™ без ЭДТА (Roche), pH 7,4) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax (PCA works) на льду. Клеточного лизиса достигали с помощью гомогенизации высокого давления (≥18,000 psi) с использованием микрофлюидайзера Model M-110S (Microfluidics). Нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 мин при ≥23300 g при 4°C.

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

Экспрессия и очистка растворимых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих.

В качестве альтернативы очистки нерастворимых связующих также может быть использована очистка растворимых связующих. Для экспрессии, выбранный клон(ы) с последующей меткой HIS<sub>6</sub>tag клонировали в вектор pET9d и экспрессировали в клетках BL21 DE3 plysS E.coli. Двадцать мл инокулята культуры (полученного из одной высеянной колонии) использовали для инокуляции 1 л среды LB или сред TB-Overnight Expression (автоиндукция), содержащей 50 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры в среде LB инкубировали при 37°C до A600 0,6-1,0, после чего на них воздействовали 1 mM изопропил-β-тиогалактозидом (IPTG) и культивировали в течение 4 ч при 30°C. Культуры, выращенные в средах TB-Overnight Expression, инкубировали при 37°C в течение 5 ч, после чего температуру снижали до 18°C и выращивали в течение 19 ч. Культуры собирали центрифугированием в течение 30 мин при ≥10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. После оттаивания клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл буфера для лизиса (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 1-кратный коктейль протеазных ингибиторов Complete™ без ЭДТА (Roche), pH 7,4) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax (PCA works) на льду. Клеточного лизиса достигали с помощью гомогенизации высокого давления (≥18,000 psi) с использованием микрофлюидайзера Model M-110S (Microfluidics). Растворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 мин при ≥23300 g при 4°C. Супернатант очищали с использованием 0,45 мкм фильтра. Очищенный лизат наносили на колонку HisTrap (GE), предварительно уравновешенную 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl, pH 7,4. Затем колонку промывали 25 объемами колонки того же самого буфера, после чего 20 объемами колонки 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl/25 mM имидазола, pH 7,4, а затем 35 объемами колонки 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl/40 mM имидазола, pH 7,4. Белок элюировали 15 объемами колонки 20 mM фосфата натрия/500 mM NaCl/500 mM имидазола, pH 7,4, фракции объединяли на основании поглощения при A<sub>280</sub> и диализовали против 1-кратного PBS или 50 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 8,5, или 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 4,5. Осадок удаляли фильтрованием с помощью 0,22 мкм фильтра.

Сайт-специфическое пегилирование аднектинов с полиэтиленгликолем.

(ПЭГ) Аднектины, содержащие сконструированный остаток цистеина, конъюгировали с ПЭГ или блокирующим цистеин реагентом с помощью химии присоединения по Михаэлю между тиольной группой на цистеине и maleimидной функциональной группой ПЭГ или n-этилmaleимида (NEM). Для пегилирования с ПЭГ 40 кДа с 2 ветвями (NOF Corporation, P/N GL2-400MA), ПЭГ добавляли в молярном избытке к раствору белка в слегка кислых или нейтральных условиях. Реакционную смесь оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение от 2 ч до ночи. Реакционную смесь затем наносили на ионообменную колонку, чтобы отделить пегилированный аднектин от непрореагировавшего ПЭГ-maleимида и непегилированного аднектина. Для пегилирования с ПЭГ 40 кДа с 4 ветвями (NOF, P/N GL4-400MA) или бис-ПЭГ 20 кДа (NOF Corporation, P/N DE-200MA), аднектин очищали от SP FF в цитратном буфере, pH 6,5. После восстановления с DTT образец обессаливали на колонке G25 в том же буфере для удаления DTT и подвергали взаимодействию с 20 кД бис-ПЭГ или ПЭГ 40 кДа с 4 ветвями в соотношении 2:1 (ПЭГ:аднектин) в течение 2 ч при комнатной температуре, и реакцию останавливали

добавлением избытка BME. Образец очищали на колонке Resource 15S (GE #17-0944-10) с выборочным удалением непегилированных видов (и монопегилированных видов в случае реакции 20 кД бис-ПЭГ). Окончательную препаративную колонку SEC (GE #17-1071-01, Superdex200, 26/60) использовали (в случае необходимости), чтобы удалить высокомолекулярные виды и непрореагировавший аднектин. Чтобы приготовить Cys-блокированный аднектин, 10-кратный молярный избыток NEM (Pierce Chemical) добавляли сразу после вышеуказанной стадии обессоливания G25 в цитратный буфер (pH 6,5). Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и реакцию останавливали путем добавления избытка BME. Затем образец интенсивно диализовали против PBS.

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

Очистка и пегилирование немеченых основанных на фибронектине каркасных белков-связующих.

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

Клеточную массу оттаивали в 1-кратном PBS в соотношении 10 мл буфера/г пасты клеток. После размораживания образец разрушали в гомогенизаторе UltraTurrax (PCA works) до получения однородной консистенции. Затем раствор пропускали два раза через микрофлюидизатор при 18000 psi. Растворимую фракцию отделяли центрифугированием в течение 30 мин при ≥10000 g при 4°C. Супернатант разводили 1:1 с ацетатом натрия (pH 4,5) и очищали с помощью фильтра 0,2 мкм. Очищенный лизат загружали на колонку SP FF (SP1; GE), предварительно уравновешенную с 50 mM ацетата натрия (pH 4,5). Затем колонку промывали 2 объемами колонки того же самого буфера, после чего 8 объемами колонки 50 mM ацетата натрия/350 mM NaCl, pH 4,5. Белок элюировали с 50 mM ацетата натрия/700 mM NaCl, pH 4,5. Элюирования объединяли на основании поглощения при A<sub>280</sub>.

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

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

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

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

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

собирали центрифугированием при  $>10000$  g в течение 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Очищенную плазмидную ДНК выделяли с использованием набора QIAGEN Plasmid Plus Mega (QIAGEN), как описано в протоколе производителя. Очищенную ДНК количественно определяли с использованием оптической плотности при 260 нм и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  перед использованием.

Клетки HEK 293-EBNA1 (клон 6E) (Yves Durocher, NRC Canada) наращивали до  $2 \times 10^6$  клеток/мл в 2 л сред F17 в мешке GE Healthcare Wave объемом 10 л при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , и смешивали покачиванием под углом  $8^{\circ}$  при 18 об/мин. ДНК получали для трансфекции следующим образом: среды F17 нагревали до  $37^{\circ}\text{C}$ . ДНК и реагент для трансфекции PEI оттаивали в стерильном биобезопасном ламинаре. ДНК (2,25 мг) добавляли к подогретым средам F17 объемом 100 мл в стерильной полипропиленовой культуральной колбе и осторожно смешивали путем вращения. В отдельной колбе 6,75 мг PEI (1 мг/мл) комбинировали с 100 мл подогретых сред F17 и осторожно смешивали путем вращения. Колбы оставляли на 5 мин перед объединением содержимого путем добавления раствора PEI в колбу, содержащую ДНК, и осторожно перемешивали путем вращения.

Содержимое колбы, содержащей смесь ДНК:PEI добавляли к одноразовому биореактору, содержащему клетки HEK 293-6E после инкубации при комнатной температуре в течение 15 мин в биобезопасном ламинаре. Мешок, содержащий трансфицированные клетки HEK 293-6E, инкубировали в течение двадцати четырех часов при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , и смешивали покачиванием под углом  $8^{\circ}$  при 18 об/мин. Через 24 ч 100 мл стерильного отфильтрованного 20% Триптона N1 (Organotechnie, Canada), растворенного в средах F17, асептически добавляли к культуре. Клетки и среды собирали после дополнительных 72 ч инкубации, как описано выше. Альтернативно, временная экспрессия HEK во встряхиваемых колбах (0,5 л сред в 2-литровой колбе) может быть выполнена с соотношением ДНК:PEI, равным 1:2. Клетки отделяли от кондиционированных сред путем центрифугирования при 6000 g в течение 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Кондиционированные среды сохраняли, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и хранили при  $4^{\circ}\text{C}$ .

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

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

Производство нерасфасованной продукции.

Экспрессия и первичное восстановление млекопитающих: система UCOE CHO.

Банк клеток млекопитающих для исследований (RCB) был создан путем трансфекции слияний антимиостатинного аднектина-FC, клонированного в вектор rUCOE, содержащий универсальный хроматинраскрывающий элемент (UCOE) [модифицированный вектор UCOE из Millipore] в CHO-S-клетки. RCB создавали путем наращивания клеток в селективных средах (0,04% (объем/объем) L-глутамин (Invitrogen) и 0,01% (об/об) дополнение HT (Invitrogen) в среде CD-CHO (Invitrogen)), содержащей 12,5 мкг/мл пуромидина. Количество клеток кратковременного пассирования асептически выделяли центрифугированием, ресуспендировали в банковских средах (0,04% (объем/объем) L-глутамин (Invitrogen), 0,01% (объем/объем) дополнение HT (Invitrogen) и 7,5% (об/об) ДМСО в среде CD-CHO (Invitrogen)) до конечной концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Эти клетки первоначально замораживали в бане с 70% изопропиловым спиртом при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение ночи и затем на следующий день переносили в жидкий азот для длительного хранения. Клеточную культуру иницировали оттаиванием в одном флаконе RCB в селективной среде объемом 25 мл, содержащей 12,5 мкг/мл пуромидина, и наращиванием культуры в тех же средах. Клеткам позволяли достичь концентрации от  $1-2 \times 10^6$  клеток/мл, прежде чем разделить обратно до  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки, как правило, поддерживали от 2 до 4 недель до посева биореактора. Нарощенную культуру пассировали в последний раз и позволяли вырасти до такой степени, чтобы биореактор объемом 15 л, содержащий 8 л сред производства (Invitrogen среды CD-CHO, содержащие 0,01% (об/об) дополнение HT (Invitrogen), 0,04% (об/об) Glutamax (Gibco) и 0,005% (об/об) Pluronic F-68 (фирма Gibco)), мог быть заполнен до конечной концентрации  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл. Биореакторную культуру контролировали ежедневно на VCD (жизнеспособную плотность клеток), процент жизнеспособности, pH и концентрацию глюкозы. Биореакторную культуру кормили на 3 и 6 дни с добавлением 10% общего объема питательных сред. Культуру собирали между 7-м и 9-м днем с процентом жизнеспособности  $>70\%$ . В процессе культивирования биореакторную культуру поддерживали при pH 7,1, температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , % DO2 40% и постоянной RPM 100.

В день сбора биореакторную культуру пропускали непосредственно через объемный фильтр 6,0/3,0



мкм с последующей стерильной 0,8/0,2 мкм фильтрацией в стерильный пакет. Очищенную стерильную культуру хранили в течение ночи при 2-8°C. Очищенную культуру затем концентрировали с помощью пластины TFF с использованием мембраны 30000 кДа. Приблизительная концентрация составляла 6-кратную, в зависимости от собранного титра. Концентрированный супернатант затем стерильно фильтровали в бутылках PETG и либо непосредственно обрабатывали, либо хранили при -80°C.

Очистка слияния антимистатиновый аднектин-Fc.

Собранный культуральный супернатант (в чистом виде или концентрированный) загружают на колонку MabSelect белок А, предварительно уравновешенную PBS. Колонку промывают с 5CV 50 mM Трис pH 8,0, 1 M мочевины, 10% PG. Слияние аднектин-Fc элюируют с 100 mM глицина, pH 3,3, собирая пик в контейнер, который ранее заряжен с 1CV 200 mM ацетата натрия pH 4,5. Пик элюции основан на поглощении при A<sub>280</sub>.

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

Разбавленное элюирование белка А пропускают через Tosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience), предварительно кондиционированный 50 mM ацетата натрия pH 4,5, в отрицательном режиме захвата. Проточный пик собирают на основании поглощения при A<sub>280</sub>. Колонку промывают 50 mM ацетата натрия и десорбируют 0,2N NaOH. Проточную AR Q 600C составляют с использованием тангенциальной проточной фильтрации, использующей 30K NMWCO мембрану из полого волокна (GE) с очень нежным смешиванием концентрата. Слияние аднектин-Fc диафильтруют в 25 mM фосфата натрия 150 mM Трегалоза pH 7,0 в течение 6 объемов и затем концентрируют до концентрации белка-мишени.

Пример 2 - биофизическая оценка антимистатиновых белков.

Эксклюзионная хроматография. Стандартную эксклюзионную хроматографию (SEC) проводили на кандидатных аднектинах, получающихся в результате процесса в середине шкалы. SEC материала середины шкалы проводили с использованием колонки Superdex 200 10/30 или на колонке Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) на системе Agilent 1100 или 1200 HPLC с УФ-обнаружением при A<sub>214</sub> nm и A<sub>280</sub> nm и с флуоресцентной детекцией (возбуждение 280 nm, излучение 350 nm). Буфер 100 mM сульфата натрия/100 mM фосфата натрия/150 mM хлорида натрия, pH 6,8 использовали в соответствующей скорости потока на используемой колонке SEC. Гель-фильтрационные стандарты (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) использовали для калибровки молекулярной массы. Результаты SEC на очищенных аднектинах середины шкалы показали преимущественно мономерный аднектин и элюирование в диапазоне приблизительно от 10 кДа против глобулярных стандартов гель фильтрации (BioRad), как показано в табл. 9 и 10.

Термостабильность. Анализ термической сканирующей флуоресценции (TSF) аднектинов НТРР проводили для экранирования их относительной термической стабильности. Образцы нормализовали до 0,2 мг/мл в PBS. 1 мкл красителя Sypro оранжевого, разбавленного 1:40 с PBS, добавляли к 25 мкл каждого образца, и планшет упаковывали с чистой заклеивающейся пленкой для 96 луночных микропланшетов. Образцы сканировали с использованием машины BioRad RT-PCR путем плавного перехода температуры от 25 до 95°C, со скоростью 2° в мин. Данные анализировали с использованием программного обеспечения BioRad CFX manager 2.0. Было показано, что значения T<sub>h</sub>, полученные с помощью TSF, хорошо коррелируют со значениями T<sub>m</sub>, полученными с помощью DSC в интервале плавления от 40 до 70°C. Это считается приемлемым рабочим диапазоном для этой техники. Результат ND ("Нет данных") получается, когда наклон кривой перехода слишком мал, чтобы позволить отличить его производный пик (скорость изменения флуоресценции с течением времени) от шума. Результат "ND" не может быть истолкован как указание термостабильности. Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) диализованных НТРР<sup>d</sup> и аднектинов середины шкалы проводили для определения их соответствующих T<sub>m</sub>. Раствор 0,5 мг/мл сканировали в VP-капиллярном дифференциальном сканирующем калориметре (GE Microcal) путем плавного изменения температуры от 15 до 110°C со скоростью 1° в мин под давлением 70 p.s.i. Данные анализировали в сравнении с контрольным запуском соответствующего буфера с использованием наиболее подходящего программного обеспечения Origin (OriginLab Corp). Результаты анализов TSF и p.s.i обобщены в табл. 8-10. Как показано в табл. 8-10, многие из клонов проявляли температуры разворачивания свыше 60°C, что указывает на высокую биофизически стабильную структуру, подходящую для лекарственного состава. Аднектины, как правило, были толерантны к пегилрованию или Fc-форматированию без видимой потери в стабильности. В некоторых случаях эти форматы получали улучшенную стабильность. Например, 3116A07 в качестве немодифицированного аднектина характеризуется T<sub>m</sub> по TSF 60°C, но при пегилровании (ATI-1377) T<sub>m</sub> по DSC составлял 68°C, а в формате Fc-X (PRD-1286) T<sub>m</sub> по DSC составлял 66°C.

Пример 3 - основанный на клетках люциферазный анализ.

Люциферазную репортерную плазмиду, реагирующей на активин элемент (ARE)-luc, получали путем лигирования девяти повторов ARE в тандеме к репортеру люциферазы светлячка. Плазмиду временно трансфицировали в клетки HepG2. Плазмиду pGL4.74[hRluc/TK] котрансфицировали для нормализации для эффективности трансфекции. 10000 клеток высевали на лунку в 96-луночный планшет. Когда

такой белок, как миостатин, активин или BMP-11, добавляют к клеткам и он связывается с родственным рецептором, запускается последующая передача сигнала SMAD, приводя к связыванию фосфорилированного комплекса SMAD с ARE. Количество, например, миостатина, экспонированного на клетке, прямо пропорционально количеству продуцируемого белка люциферазы и, следовательно, измеренной активности люциферазы. Когда антагонист миостатина (например, антимиостатиновый аднектин) добавляют одновременно с миостатином к клеткам, активация ARE уменьшается, что приводит к снижению производства и активности люциферазы.

В этом эксперименте (1) антимиостатиновый аднектин и миостатин, (2) антимиостатиновый аднектин и активин А или (3) антимиостатиновый аднектин и BMP-11 предварительно инкубировали перед добавлением к клеткам. Миостатин (R&D Systems) использовали в концентрации 10-500 пМ, активин А (R&D Systems) в концентрации 10-500 пМ и BMP-11 (R&D Systems) в концентрации 10-500 пМ. После инкубации в течение ночи с этими различными комбинациями клетки лизировали и измеряли активность люциферазы (люминесценцию) с использованием Dual-Glo Luciferase Assay System® (EnVision). IC50 определяли как концентрацию аднектина, необходимую для достижения 50%-ного ингибирования индуцированной миостатином активности ARE-люциферазы.

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

Пример 4 - анализ связывания HTRF.

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

Таблица 8

Биофизическая характеристика, результаты ARE-люциферазного репортерного анализа и анализа HTRF связывания для антимиостатиновых моноаднектинов

| ID       | Tm - TSF | Tm-DSC | ARE-люциферазный анализ |                  |                      | HTRF          |
|----------|----------|--------|-------------------------|------------------|----------------------|---------------|
|          |          |        | IC50 мио (нМ)           | IC50 BMP-11 (нМ) | IC50 активина А (нМ) | IC50 мио (нМ) |
| 1979_B06 |          | 48     | 0,11                    | 3,3              | 194                  | ND            |
| 2062_G02 |          | 48     | 205                     | 1500             | >1500                | ND            |
| 2522_C09 | 40       |        | 0,06                    | 1,6              | 1000                 | ND            |
| 2523_G06 | 49       | 49     | 4,2                     | 46               | >2000                | ND            |
| 2524_C11 | ND       | 55     | 0,1                     | 0,89             | 765                  | ND            |
| 2524_D09 | 54       | 49     | 0,06                    | 0,55             | 84                   | ND            |
| 2524_E10 | ND       |        | 0,09                    | 5,6              | >1000                | ND            |
| 2524_H05 | 40       |        | 0,09                    | 7,3              | >1000                | ND            |
| 2524_H11 | 49       |        | 0,03                    | 6,2              | >1000                | ND            |
| 2525_B01 | ND       |        | 0,11                    | 3,2              | 73                   | ND            |
| 2525_D02 | 58       | 55     | 0,05                    | 1,1              | 345                  | ND            |
| 2525_D05 | ND       | 69     | 0,11                    | 3,9              | >1000                | ND            |
| 2525_F07 | 46       |        | 0,13                    | 3,4              | >1000                | ND            |

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

Таблица 9

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

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

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

| ID       | Tm<br>-<br>TSF | Tm-<br>DSC                 | %<br>мономеров<br>(SEC) | ARE-люциферазный анализ |                      |                            | HTRF             |
|----------|----------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|------------------|
|          |                |                            |                         | IC50 мио<br>(нМ)        | IC50 BMP-<br>11 (нМ) | IC50<br>активина А<br>(нМ) | IC50 мио<br>(нМ) |
| PRD-932  |                |                            |                         | 0,24                    | ND                   | ND                         | ND               |
| PRD-1171 |                |                            |                         | 0,08                    | 0,20                 | 19                         | 0,14             |
| PRD-1173 |                |                            |                         | 0,02                    | 0,10                 | 6                          | 0,12             |
| PRD-1174 |                | Tm1 61<br>Tm2 67<br>Tm3 83 |                         | 0,04                    | 0,10                 | 4                          | 0,09             |
| PRD-1175 |                |                            |                         | 0,10                    | 0,28                 | 19                         | 0,15             |
| PRD-1177 |                |                            |                         | 0,16                    | 0,28                 | 21                         | 0,64             |
| PRD-1178 |                | Tm1 60<br>Tm2 69<br>Tm3 84 |                         | 0,08                    | 0,25                 | 16                         | 0,27             |
| PRD-1180 |                | Tm1 68<br>Tm2 83           |                         | 0,07                    | 0,11                 | 14                         | 0,13             |
| PRD-1284 |                |                            |                         | 0,02                    | 0,04                 | 44                         | 0,62             |
| PRD-1285 |                | Tm1 67<br>Tm2 68<br>Tm3 80 | 97                      | 0,05                    | 0,03                 | 216                        | 0,49             |
| PRD-1286 |                | Tm1 66<br>Tm2 68<br>Tm3 81 | 99                      | 0,10                    | 0,11                 | 94                         | 0,73             |
| PRD-1287 |                |                            |                         | 0,30                    | 0,80                 | >1000                      | 2,70             |
| PRD-1288 |                | Tm1 65<br>Tm2 69<br>Tm3 81 | 93                      | 0,08                    | 0,10                 | >1000                      | 0,47             |
| PRD-1301 |                |                            |                         | 0,06                    | 0,06                 | 15                         | 0,07             |
| PRD-1302 |                |                            |                         | 0,03                    | 0,02                 | 14                         | 0,12             |
| PRD-1303 |                |                            |                         | 0,02                    | 0,03                 | 314                        | 0,11             |
| PRD-1304 |                |                            |                         | 0,05                    | 0,07                 | 45                         | 0,24             |
| PRD-1305 |                |                            |                         | 0,06                    | 0,07                 | 113                        | 0,10             |
| PRD-1471 |                | Tm1 62<br>Tm2 68<br>Tm3 81 | 99                      | 0,16                    | 0,16                 | 60                         | 0,47             |
| PRD-1472 |                | Tm1 62<br>Tm2 69<br>Tm3 80 | 100                     | 0,07                    | 0,05                 | 1000                       | 0,41             |
| PRD-1473 |                | Tm1 63<br>Tm2 69<br>Tm3 81 | 100                     | 0,07                    | 0,06                 | 125                        | 0,73             |
| PRD-1474 |                | Tm1 63<br>Tm2 69<br>Tm3 81 | 100                     | 0,08                    | 0,09                 | >1000                      | 0,45             |

Пример 5 - опосредованное антимиостатиновым аднектином ингибирование индуцированного мио-статином SMAD2 фосфорилирования.

Человеческие клетки рабдомиосаркомы RH41 (DSMZ, Braunschweig, Germany) использовали для описанного ниже 12-, 2- и 4-точечного анализа реакции ингибирования. Клетки удаляли из культуральной среды, промывали для удаления сыворотки и стабилизировали в содержащих БСА средах для анализа в течение 4 ч. Клетки снимали с колбы с использованием версена и переносили в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-дном по  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Для 12-балльной реакции ингибирования к клеткам добавляли 100 нМ рекомбинантного миостатина (R&D Systems), предварительно инкубированного в течение 1 ч с 5-кратным разведением диапазона концентраций аднектинов, начиная с 1000 нМ (т.е. 1000,

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

Таблица 11

Ингибирование SMAD2 фосфорилирования (pSMAD2) антимиостатиновыми аднектинами

| Анализ pSmad2              |                              |                             |                                  |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| ID                         | IC50 мио (нМ)<br>12-точечный | IC50 мио (нМ)<br>4-точечный | % ингибирования<br>мио при 10 нМ |
| 1979_B06<br>(aka ATI-1133) | 12,8±2,4                     |                             |                                  |
| 2062_G02<br>(aka ATI-1134) | 59,1±16,2                    |                             |                                  |
| 2522_C09                   | 0,13                         |                             |                                  |
| 2523_G06                   | 0,78                         |                             |                                  |
| 2524_C11                   | 0,14                         |                             |                                  |
| 2524_D09                   | 0,11                         |                             |                                  |
| 2524_E10                   | 0,13                         |                             |                                  |
| 2524_H05                   | 0,13                         |                             |                                  |
| 2524_H11                   | 0,11                         |                             |                                  |
| 2525_B01                   | 0,14                         |                             |                                  |
| 2525_D02                   | 0,36                         |                             |                                  |
| 2525_D05                   | 0,20                         |                             |                                  |
| 2525_F07                   | 0,27                         |                             |                                  |
| 3006_A10                   |                              |                             | 51                               |
| 3007_B08                   |                              |                             | 97                               |
| 3007_C09                   |                              |                             | 80                               |
| 3007_C10                   |                              |                             | 76                               |
| 3008_A03                   |                              |                             | 87                               |
| 3008_B08                   |                              |                             | 90                               |
| 3008_D04                   |                              |                             | 92                               |
| 3008_F01                   |                              |                             | 86                               |
| 3008_G01                   |                              |                             | 98                               |
| 3008_G03                   |                              |                             | 91                               |
| 3115_D04                   |                              | 0,06                        |                                  |
| 3115_E06                   |                              | 0,06                        |                                  |
| 3116_A06                   |                              | 0,27                        |                                  |
| 3116_A07                   |                              | 0,06                        |                                  |
| 3116_C01                   |                              | 0,26                        |                                  |
| 3116_C06                   |                              | 0,73                        |                                  |
| 3116_H06                   |                              | 0,06                        |                                  |
| 3146_A08                   |                              | 0,78                        |                                  |

Пример 6 - измерения аффинности SPR для антимиостатиновых аднектинов. Кинетика связывания аднектина с использованием формата A SPR.

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

вого аднектина применяли ко всем проточным ячейкам в проточном буфере HBSP. Регенерация поверхности чипа между циклами достигала с двумя 30-секундными импульсами 3 М  $MgCl_2$ . Кинетические кривые эталонно-вычитенных сенсограмм приспособляли к модели связывания 1:1с использованием программного обеспечения Biaevaluation. Сводные кинетические данные Biacore приведены в табл. 12.

Приведенные в табл. 12 данные указывают на то, что оптимизированные аднектины следующего поколения плотно связываются с миостатином с  $K_D$  в диапазоне 0,06-1,47 нМ, по сравнению с исходными аднектинами 1979\_B06 и 2062\_G02, которые демонстрировали  $K_D$  29 и 49 нМ соответственно. После пегилирования происходит некоторая потеря в миостатиновой аффинности с  $K_D$  от 0,76 до 14,4 нМ, хотя нет никакого эффекта пегилирования на активность в ARE-люциферазном анализе (смотрите табл. 8 и 9).

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

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

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

Таблица 12

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

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

Пример 7 - жидкофазная аффинность для антимиостатиновых аднектинов.

Аффинность в растворе PRD-1474, Fc-слитого антимиостатинового аднектина к миостатину измеряли с использованием анализа кинетического исключения (KinExA). Повторяющиеся четыре раза титрования PRD-1474 выполняли с миостатином при концентрации мономера 2 нМ (n=2), 1 нМ (n=1) и 0,7 нМ (n=1). Относительную концентрацию несвязанного миостатина измеряли с помощью захвата на твердой матрице ATI-1310 (соединенной с полиакриламидными гранулами с помощью сконструированного свободного цистеина) с последующим обнаружением с флуоресцентно меченым конструктором миостатинового корцептора, ActRIIB-Ig, который может связываться с миостатином одновременно с аднектином. ATI-1310 родственен аднектину, который конкурирует с PRD-1474 за связывание с миостатином и позволяет захват несвязанного миостатина. Глобальный анализ K<sub>d</sub>, приведенный в табл. 13, дает K<sub>d</sub> 170 пМ с 95% доверительным интервалом 330-60 пМ. Аффинности PRD-1177 и ATI-1338 также измеряли с использованием того же формата анализа. Троекратные титрования PRD-1177 выполняли с миостатином при концентрации мономера 1 нМ (n=2) и 0,8 нМ (n=1). Троекратные титрования ATI-1338 выполняли с миостатином при концентрации мономера 5 нМ (n=1), 1,6 нМ (n=1) и 1,4 нМ (n=1). Эти анализы указывают на то, что PRD-1177 связывается с миостатином с глобальным значением K<sub>d</sub> 250 пМ и 95% доверительным интервалом 340-130 пМ (табл. 13). ATI-1338 связывается с миостатином с глобальным значением K<sub>d</sub> 850 пМ и 95% доверительным интервалом 1400-330 пМ.

Таблица 13

Измерения с помощью KinExA жидкофазной аффинности к связывающему миостатину

| Аднектин | K <sub>d</sub> | 95% доверительный интервал: |                       |
|----------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
|          |                | K <sub>d</sub> высокая      | K <sub>d</sub> низкая |
| PRD-1474 | 170 пМ         | 330 пМ                      | 60 пМ                 |
| PRD-1177 | 250 пМ         | 340 пМ                      | 130 пМ                |
| ATI-1338 | 850 пМ         | 1400 пМ                     | 330 пМ                |

Пример 8 - мутационный анализ 3116\_A06.

Для того чтобы понять относительную толерантность положений петли к мутациями, проведены два аналогичных, но отдельных исследования. Первое представляло собой традиционное аланиновое сканирование, где связывание и эффективность отдельных аланиновых мутаций в петлях аднектина 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) оценивали в биохимических и основанных на клетках анализах. Второе исследование представляло собой глубокое мутационное сканирование, в котором авторы настоящего изобретения создали библиотеку моносайтовых мутаций в одинаковых положениях 3116\_A06 (SEQ ID 118), но с замещенным каждым положением на 20 возможных аминокислот. Эти компоненты библиотеки затем экспрессировали как слияния белок-мРНК и подвергали одному раунду дисплея мРНК (как описано в разделе IV), разделяя компоненты библиотеки, связанные с биотинилированным миостатином от тех, кто остался несвязанным, с использованием стрептавидиновых магнитных гранул. В этом подходе секвенирование следующего поколения вводных и связанных поколений позволяло определение относительного обогащения/обеднения каждой последовательности, отражая их внутреннюю аффинность к миостатину. Аланиновое сканирование: сайт-направленный мутагенез ПЦР использовали для создания моносайтовых аланиновых мутаций в 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118) в петле BC (остатки 25-33), петли DE (остатки 55-58) и петли FG (остатки 80-89). Клоны экспрессировали в E.coli и очищали с помощью HTPP, как описано в примере 1. Эксклюзионная хроматография (SEC, как описано в примере 2) подтвердила, что все аланин-замещенные белки представляли собой преимущественно мономерные (табл. 14). Проводили как ARE-люциферазный (пример 3), так и HTRF анализы (пример 4). В анализе конкурентного связывания HTRF активности варьировали в диапазоне от IC<sub>50</sub>=1,5 нМ до >100 нМ (табл. 14). Большинство положений переносили аланиновое замещение в анализе HTRF в некоторой степени, за исключением Gly55, Arg56 и Gly57 петли DE, для которых связывание было значительно меньше (IC<sub>50</sub>>100 нМ). Меньший эффект происходил в положениях Gly30 петли BC и Val80, Thr81 и Tyr88 петли FG, которые все еще показывали связывание, но с >10-кратным увеличением IC<sub>50</sub>, по отношению к исходной последовательности ("WT"). В ARE-люциферазном основанном на клетках анализе активность мутантов варьировала в диапазоне от IC<sub>50</sub>=0,6 нМ до >100 нМ (табл. 14). Эффект аланиновых мутаций в целом был больше в основанном на клетках анализе по отношению к анализу HTRF. Gly55, Arg56 и Gly57 петли DE и Val80 и Tyr88 петли FG все отображают резкое снижение активности в данном анализе, с IC<sub>50</sub>>100 нМ. Более умеренный эффект наблюдался для положений BC Leu26, Pro27, His28, Gly30 и Asn33 и положений FG Thr81, Tyr85 и Leu86, все из которых характеризовались IC<sub>50</sub>>10-кратным, чем исходная последовательность.

Таблица 14

Биохимическая характеристика и основанные на клетках активности аланиновых мутантов 3116\_A06

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

\* SEC 1: высокомономерный;

SEC 2: в основном мономерный.

Глубокое мутационное сканирование. Высокопроизводительное секвенирование комбинировали с дисплеем белка, чтобы позволить одновременное измерение относительной пригодности каждого возможного моносайтового мутанта петли, в масштабе, который был бы обременительным для традиционного подхода, как описано выше (для обзора подходов "Глубокого мутационного сканирования", смотрите Araya et al., Trends in Biotechnology 29: 435-442, 2011; сходный подход дополнительно проиллюстрирован в Forsyth et al., mAbs 5: 523-532, 2013). Конструирование и выбор библиотеки: Создавали три отдельные библиотеки, которые содержали каждую возможную моносайтовую мутацию в каждой из трех петель 3116\_A06 (SEQ ID NO: 118): петля BC (положения 25-33), петля DE (положения 55-58) и петля FG (положения 80-89). Для каждой петли разрабатывали несколько олигонуклеотидов, которые по отдельности включали в кодон NNK в каждом положении, где N=A, C, G, T и K=G, T. Использование этих вырожденных кодонов позволяет кодирование всех 20 аминокислот (плюс стоп-кодон) в положение, в котором NNK включен. Олигонуклеотиды собирали с помощью расширения перекрытия ПЦР, чтобы создать библиотеки полноразмерных аднектинов, где Lib-BC, содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли BC 3116\_A06, Lib-DE содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли DE 3116\_A06 и Lib-FG содержал каждую мутацию одной аминокислоты петли FG 3116\_A06. Экспрессировали три библиотеки как молекул слияний мРНК-белок с использованием PROfusion в соответствии с Xu et al., Chemistry & Biology 9: 933-942, 2002. Молекулы PROfusion Lib-BC, Lib-DE и Lib-FG отдельно выбирали против 3 нМ биотинилированного миостатина, и связывающие молекулы впоследствии захватывали на стрептавидиновых магнитных гранулах. Связывающие элюировали из гранул с использованием 100



мМ КОН. Молекулы, элюированные из гранул, представляют собой варианты 3116\_A06, которые все еще могут связываться с миостатином, в то время как те, которые присутствуют в исходной библиотеке, но не найдены в элюции, представляют собой варианты 3116\_A06, которые не связываются с миостатином.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

С использованием данных полного глубокого мутационного сканирования, положения 25, 26, 27, 30, 32 и 33 петли BC, положения 55, 56 и 57 петли DE и положения 80 и 88 петли FG, кажутся наиболее сохраненными, когда только один или несколько типов аминокислот в этих положениях поддерживают связывание с миостатином. С другой стороны, другие положения представляют собой высоко устойчивые к мутации, включая в себя положения 28, 29 и 31 петли BC и положения 82, 83 и 87 петли FG.

Пример 9 - оценка фармакокинетики антимиостатиновых аднектинов.

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

Таблица 16

Фармакокинетическое сравнение трех пегелированных форматов для аднектина 2987\_H07

| PK параметры                        | ATI-1338 | ATI-1339 | ATI-1341 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|
| Доза (мг/кг)                        | 5        | 3,9      | 4        |
| С <sub>max</sub> /Доза (нМ/(мг/кг)) | 547      | 370      | 113      |
| T <sub>max</sub> (ч)                | 24       | 24       | 4        |
| AUC/Доза (нМ*ч/(мг/кг))             | 32       | 23       | 2,1      |
| t <sub>1/2</sub> (ч)                | 25       | 31       | 16       |

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

Таблица 17

Фармакокинетическое сравнение трех Fc-слитых антимиостатиновых аднектинов

| PK параметры            | PRD-1177 | PRD-1286 | PRD-1474 |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| Доза (мг/кг)            | 2        | 2        | 2        |
| Выведение (мл/мин/кг)   | 0,017    | 0,016    | 0,014    |
| V <sub>dss</sub> (л/кг) | 0,093    | 0,190    | 0,054    |
| t <sub>1/2</sub> (ч)    | 68       | 172      | 58       |
| Биодоступность SC       | 60%      | 100%     | 94%      |

Пример 10 - механизм ингибирования антимиостатиновых аднектинов.

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

SPR конкуренция. Конкурентные анализы связывания для оценки способности антимиостатиновых аднектинов конкурировать с рецепторами Type I и Type II за связывание с миостатином или BMP11, как суррогата миостатина, также проводили с использованием SPR на приборе Biacore T100 в двух различ-

ных экспериментальных форматах. В "SPR формата А" поверхности сенсорного чипа подготавливали путем иммобилизации 100 мкг/мл белка А (Pierce) в 10 мМ уксуса pH от 4,5 до 4,500 RU на сенсорном чипе CM5 (Biacore/GE Healthcare) с использованием стандартной этил(диметиламино-пропил)карбодимидной (EDC)/N-гидроксисукцинимидной (NHS) химии с блокированием этаноламина. ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems), ActRIIB-Fc (собственного производства), моноклональное антитело к миостатину/BMP11 (mAb-A), которое конкурирует за связывание с миостатином с ActRIIB, но не конкурирует с 3116\_A06 за связывание с миостатином (собственного производства), или аднектин-Fc PRD-1474 в концентрациях 7-13 мкг/мл захватывали через хвост Fc к поверхностным плотностям 1600-4300 RU с использованием 60 с введений при 10 мкл/мин. Сравнительные эксперименты выполняли с помощью следующих 100 нМ миостатина (R&D Systems) или BMP11 (R&D Systems) на этих поверхностях в отсутствие или в присутствии 200 нМ аднектина ATI-1523 при скорости потока 30 мкл/мин с 180 с ассоциации и диссоциации. Протекающий буфер для иммобилизации и сравнительных экспериментов представлял собой 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4, и поверхности регенерировали между циклами с использованием двух введений 10 мМ глицина, pH 1,5 в течение 30 с при 30 мкл/мин.

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

Таблица 18

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

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

Конкуренция аднектина с использованием "SPR формата В". Механизм действия антимиостатиновых аднектинов дополнительно оценивали в "SPR формата В", где миостатин или BMP11 (10 мкг/мл в 10 мМ уксуса pH 4,5) непосредственно фиксировали на поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием химии связывания EDC/NHS до плотности 985 RU (миостатин) или 530 RU (BMP11). В настоящем документе реакцию связывания для рецепторов ALK4-Fc (R&D Systems), ALK5-Fc (R&D Systems) или мономера ActRIIB (произведенный своими силами), введенных в одиночку (2 мкМ в течение 180 с при 30 мкл/мин), сопоставляли с реакциями связывания для этих рецепторы после предварительного связывания слияния аднектин-Fc PRD-1474 с поверхностью (1 мкМ для 480 с при 30 мкл/мин). Подвижный буфер для иммобилизации и сравнительных экспериментов представлял собой 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об/об поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4, и поверхности регенерировали между циклами с использованием 4 введений 50 мМ NaOH в течение 15 с при 30 мкл/мин. В отсутствие PRD-1474 каждый рецептор связывался специфически с иммобилизованным BMP11, тогда как только ALK5-Fc и мономер ActRIIB, но не ALK4-Fc, связывались с иммобилизованным миостатином. Предварительное связывание PRD-1474 значительно уменьшало сигнал связывания для ALK4-Fc по отношению к BMP11 (уменьшение на 70%), а также уменьшало связывание ALK5-Fc по отношению к миостатину или BMP11 (уменьшение на 35-41%), но характеризовалось минимальным эффектом на связывание мономера ActRIIB как миостатиновой, так и BMP11 поверхностью, табл. 19. Эти данные, взятые вместе с данными конкуренции SPR из "SPR формата А" (табл. 18), данными конкурентного анализа ELISA (фиг. 10) и полным ингибированием миостатиновой передачи сигналов, наблюдаемым в ARE-

люциферазном анализе (фиг. 11), показывают, что аднектиновый механизм действия представляет собой блокаду вовлечения рецепторов передачи сигналов Type I (ALK4/5), и что аднектины не конкурируют со связыванием с рецепторами Type II (ActRIIB).

Таблица 19

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

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

Так как эти аднектины представляют собой семейства последовательностей, примеры которых приведены в настоящем изобретении, и индивидуальных клоны в рамках четко определенного семейства последовательностей сохраняют тот же сайт связывания, последовательности, покрытые настоящим изобретением, действуют путем блокирования вовлечения ALK4/5 в комплексе миостатин-ActRIIB. Фармакокинетические данные дополнительно указывают на то, что содержание комплексов миостатина-аднектина со временем накапливается и что эти комплексы связываются с ActRIIB, таким образом действуя в качестве доминантного негативного ингибитора передачи сигналов, не зависимой от свободного лекарственного средства. Этот уникальный механизм отличает антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению от антител к миостатину, описанных в литературе (например, US 7632499), а также указывает на то, что антимиостатиновые аднектины согласно настоящему изобретению характеризуются увеличенной активностью.

Пример 11 - картирование сайта связывания аднектина на миостатине с использованием HDX-МС.

Сайт связывания аднектина на миостатином дополнительно оценивали с использованием водород-дейтериевой обменной масс-спектрометрии (HDX-MS). Способ водород-дейтериевой обменной масс-спектрометрии (HDX-МС) исследует конформацию белка и конформационную динамику в растворе путем контроля скорости обмена дейтерия и степени в амидных атомах водорода остова. Уровень HDX зависит от растворимой доступности амидных атомов водорода остова и конформации белка. Увеличение массы белка при HDX может быть точно измерено с помощью МС. Когда эту технику сочетают с ферментативным расщеплением, могут быть получены структурные особенности на уровне пептида, делая возможной дифференциацию экспонированных на поверхности пептидов сложенных внутри или из изолированных на границе белок-белкового комплекса. Как правило, выполняется мечение дейтерием и последующие эксперименты гашения с последующим расщеплением пепсином, разделением пептидов и анализом МС.

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

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

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

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

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

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

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

Пример 12 - стыковка аднектина 3116\_A06 на миостатине *in silico*.

Вычислительный подход использовали для создания структурной модели комплекса миостатина 3116\_A06, которая согласуется с данными HDX-МС (фиг. 13). Белковую стыковку 3116\_A06 в структуре человеческого миостатина (PDB 3HH2 взят из банка белковых данных, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); Cash et al., EMBO J. 28:2662-2676, 2009) проводили с использованием ZDOCK (Chen and Wang, Proteins 47:281-294, 2002), реализованном в программном обеспечении Accelrys Discovery Studio v3.5 (Accelrys). Протокол ZDOCK использует стыковку твердого тела двух белковых структур (лиганд = 3116\_A06 и рецептор = миостатин). Стыкованные ориентации фильтровали для комплексов, которые содержали конформации петель 3116\_A06 FG (остатки от Thr79 до Tyr88) и BC (остатки от Ser25 до N33). Предпочтительный комплекс выбирали на основании комплементарности остатков границы в сочетании с корреляцией благоприятных замещений петель, идентифицированных с помощью мутагенеза аднектина. На фиг. 13A показан сайт связывания ALK4 и сайт связывания ActRIIB, картированный на структуре миостатина (серый). Область 1 и область 2, которые были идентифицированы с помощью экспериментов HDX-МС, как описано в примере 11, обозначены черным цветом. На фиг. 13B показан предпочтительный комплекс от стыковки с петлями BC, DE и FG 3116\_A06 (черный) в виде стержневой визуализации, и области 1 и 2 миостатина (серый), представленные в виде заполненного пространства. Несколько остатков, которые идентифицировали в качестве благоприятных мутаций петель, показывают ключевые вклады. Например, в петле BC 3116\_A06 остатки Ser25, Leu26 и Pro27 важны в качестве структурных ограничений для поддержания общей конформации петли. В отличие от этого, Ala32 подходит для небольшой гидрофобной щели, образованной на границе комплекса, и остов остатка образует водородные связи с миостатином. Наиболее предпочтительные замены в положении 32 представляют собой Gly или Leu, и они, по прогнозам, также подходят вместо аланина. Сходным образом, Asn33 участвует в образовании водородных связей с близлежащими триптофановыми остатками миостатина. Наиболее предпочтительные замены в положении 33 представляют собой His и Gln, которые также содержат боковые цепи, которые могут вносить вклад в качестве доноров водородной связи. Остатки в петле DE характеризуются решающим значением: самые благоприятные замены ограничены Gly55, Arg56 и Gly 57, и только консервативные замены предпочтительны для Val58. В структуре модели Arg56 представляет собой критический остаток, вносящий вклад во взаимодействия пи катионов с Y86 миостатина в области 1, а также дополнительные водородные связи с остовом и боковой цепью других остатков области 1. Для многих остатков петли FG наиболее предпочтительные замены представляли собой консервативные замены. Одно из важнейших идентифицированных положений представлял собой Tyr88, который характеризуется взаимодействиями пи катионов и взаимодействиями пи-пи с Y55 и другими остатками из области 2 миостатина. Петля FG также участвует в нескольких гидрофобных взаимодействиях как с областью 1, так и с областью 2, идентифицированных из экспериментов по мутагенезу. Эти расчеты хорошо согласуются с экспериментальными данными HDX-МС и SPR.

Пример 13 - мышинная модель мышечноскелетной эффективности *in vivo*.

Мышей-самцов B6.SCID (9-13 недель, Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) размещали в помещении с контролируемой температурой с обратным 12-часовым циклом свет/темнота. Вода и стандартная пища была доступна без ограничений. Мышей случайным образом рандомизировали и распределяли между группами лечения для получения либо контроля, либо исследуемых соединений согласно настоящему изобретению на основании веса (приблизительно 20-22 г). Для того чтобы продемонстрировать эффективность *in vivo* соединений согласно настоящему изобретению, соединения вводили либо еженедельно (Fc-слитые антимиостатиновые аднектины), либо два раза в неделю (пегилированные антимиостатиновые аднектины) путем подкожной инъекции. Исследуемые соединения вводили животным в фосфатно-солевом буфере (PBS). На контроли воздействовали только восстановительным буфером. Экспериментальным животным (n=8-10 мышей/группу) вводили в течение 14 дней подкожно, например, с 5, 6 или 10 мг/кг/неделю соединения согласно настоящему изобретению. Измерения веса тела регистрировали перед рандомизацией, в день рандомизации и два-три раза в неделю в течение периодов лечения и в конце исследования. Массу мышц голени записывали в конце исследования с помощью анализа количественной магнитно-резонансной томографии (MPT, Echo Medical Systems, Техас). Опытные группы сравнивали с контрольной группой. Результаты показывают, что антимиостатиновые аднектины соглас-

но настоящему изобретению увеличивали процент веса тела, по сравнению с исходным уровнем (фиг. 14) и характеризовались значительным анаболическим воздействием на объем скелетных мышц (фиг. 15), по сравнению с контрольными мышцами (например, приблизительно 7-10% увеличение объема мышц, по сравнению с контролем).

Магнитно-резонансная визуализация (MRI).

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

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

Статистика.

Различия между группами оценивали с использованием парного t-критерия.

Стьюдента со значением хвосты=2.

Пример 14 - эффективность PRD-1474 на рост мышц *in vivo*.

Мышей-самцов B6.SCID (n=10/группа) поддерживали и лечили, как описано в примере 10, за исключением того, что PRD-1474 вводили в различных дозах, как показано на фиг. 16, и продолжительность лечения составляла 28 дней. PRD-1474 в дозе 1 мг/кг показал значительное увеличение 11,1% в объеме мышц голени, по сравнению с контрольной группой PBS (p <0,0001). Значительное увеличение объема мышц голени 27,7%, 29,7% и 32,8% наблюдалось также с PRD-1474 в дозе 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг соответственно. Никаких изменений в объеме сердца не наблюдалось во всех подвергнутых лечению группах, по сравнению с контрольными.

Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Группы с различными дозировками сравнивали с использованием дисперсионного анализа. (\*p<0,0001; # не значимое различие между группами).

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

Варианты осуществления.

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина III типа (<sup>10</sup>Fn3), причем <sup>10</sup>Fn3 содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, DE и FG, с измененной аминокислотной последовательностью относительно последовательности соответствующей петли домена <sup>10</sup>Fn3 человека и причем полипептид связывается мииостатином.

2. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид связывается с мииостатином с K<sub>D</sub> менее чем 500 нМ.

3. Полипептид согласно вариантам осуществления 1 или 2, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле X<sub>1</sub>-L-P-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>, где

- (a) X<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из S, T и Y;
- (b) X<sub>2</sub> выбирают из группы, состоящей из H, Y, N, R, F, G, S и T;
- (c) X<sub>3</sub> выбирают из группы, состоящей из A, P, Q, S, F, H, N и R;
- (d) X<sub>4</sub> выбирают из группы, состоящей из G и A;
- (e) X<sub>5</sub> выбирают из группы, состоящей из H, L, R, V, N, D, F, I и K;
- (f) X<sub>6</sub> выбирают из группы, состоящей из A, L, G, M, F, I и V и
- (g) X<sub>7</sub> выбирают из группы, состоящей из H и N.

4. Полипептид согласно варианту осуществления 3, в котором  $X_1$  представляет собой С.
5. Полипептид согласно вариантам осуществления 3 или 4, в котором  $X_2$  представляет собой Н или Y.
6. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-5, в котором  $X_3$  представляет собой А или Р.
7. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-6, в котором  $X_4$  представляет собой G.
8. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-7, в котором  $X_5$  представляет собой Н, L или R.
9. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-8, в котором  $X_6$  представляет собой А или L.
10. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 3-9, в котором  $X_7$  представляет собой Н.
11. Полипептид согласно варианту осуществления 3, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38.
12. Полипептид согласно варианту осуществления 11, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34.
13. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $G-R-G-X_8$ , где  $X_8$  представляет собой V или L.
14. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42.
15. Полипептид согласно варианту осуществления 14, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.
16. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ , где
  - (a)  $X_9$  выбирают из группы, состоящей из L, V и I;
  - (b)  $X_{10}$  выбирают из группы, состоящей из T и S;
  - (c)  $X_{11}$  выбирают из группы, состоящей из K, R, A, G, S, D, H, N, T и P;
  - (d)  $X_{12}$  выбирают из группы, состоящей из S, T, A, E, H, K и N;
  - (e)  $X_{13}$  выбирают из группы, состоящей из K, G, Q, D, E, N, T и S;
  - (f)  $X_{14}$  выбирают из группы, состоящей из V, I, F, L, M, P, T и Y;
  - (g)  $X_{15}$  выбирают из группы, состоящей из I, L и Y;
  - (h)  $X_{16}$  выбирают из группы, состоящей из H, I, V, K, L, R, F, G, S и T;
  - (i)  $X_{17}$  выбирают из группы, состоящей из Y и H и
  - (j)  $X_{18}$  выбирают из группы, состоящей из K, M, L, R и V.
17. Полипептид согласно варианту осуществления 16, в котором  $X_9$  представляет собой L или V.
18. Полипептид согласно вариантам осуществления 16 или 17, в котором  $X_{10}$  представляет собой T.
19. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-18, в котором  $X_{11}$  представляет собой K или R.
20. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-19, в котором  $X_{12}$  представляет собой S или T.
21. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-20, в котором  $X_{13}$  представляет собой K, G или Q.
22. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-21, в котором  $X_{14}$  представляет собой V или I.
23. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-22, в котором  $X_{15}$  представляет собой I.
24. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-23, в котором  $X_{16}$  представляет собой H, I или V.
25. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-24, в котором  $X_{17}$  представляет собой Y.
26. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 16-25, в котором  $X_{18}$  представляет собой K или M.
27. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 50-62, 64-72, 75-77 и 79.
28. Полипептид согласно варианту осуществления 27, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75.
29. Полипептид согласно вариантам осуществления 1 или 2, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$ , где



- (a)  $X_{19}$  выбирают из группы, состоящей из D, E, V и W;
  - (b)  $X_{20}$  выбирают из группы, состоящей из A, S и V;
  - (c)  $X_{21}$  выбирают из группы, состоящей из R, A, G, K и L и
  - (d)  $X_{22}$  выбирают из группы, состоящей из L и R.
30. Полипептид согласно варианту осуществления 29, в котором  $X_{19}$  представляет собой D.
31. Полипептид согласно вариантам осуществления 29 или 30, в котором  $X_{20}$  представляет собой A.
32. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-31, в котором  $X_{21}$  представляет собой R или A.
33. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-32, в котором  $X_{22}$  представляет собой L.
34. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 29-33, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-10, 22, 32, 33 и 35.
35. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1, 2 и 27-34, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{23}$ -G-R-G- $X_{24}$ , где
- (a)  $X_{23}$  выбирают из группы, состоящей из V, P, F, I и L и
  - (b)  $X_{24}$  выбирают из группы, состоящей из S, N и T.
36. Полипептид согласно варианту осуществления 35, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41 и 43-45.
37. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1, 2 и 29-36, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{25}$ - $X_{26}$ -R- $X_{27}$ -G- $X_{28}$ - $X_{29}$ - $X_{30}$ - $X_{31}$ - $X_{32}$ , где
- (a)  $X_{25}$  выбирают из группы, состоящей из I и V;
  - (b)  $X_{26}$  выбирают из группы, состоящей из F, D и Y;
  - (c)  $X_{27}$  выбирают из группы, состоящей из D и T;
  - (d)  $X_{28}$  выбирают из группы, состоящей из P, M, V и T;
  - (e)  $X_{29}$  выбирают из группы, состоящей из V, L, N, R и S;
  - (f)  $X_{30}$  выбирают из группы, состоящей из H, T, L, N, Q и S;
  - (g)  $X_{31}$  выбирают из группы, состоящей из F, W, Y, H и L и
  - (h)  $X_{32}$  выбирают из группы, состоящей из D, A и G.
38. Полипептид согласно варианту осуществления 37, в котором  $X_{25}$  представляет собой I.
39. Полипептид согласно вариантам осуществления 37 или 38, в котором  $X_{26}$  представляет собой F.
40. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-39, в котором  $X_{27}$  представляет собой D.
41. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-40, в котором  $X_{28}$  представляет собой P.
42. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-41, в котором  $X_{29}$  представляет собой V.
43. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-42, в котором  $X_{30}$  представляет собой H или T.
44. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-43, в котором  $X_{31}$  представляет собой F или W.
45. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-44, в котором  $X_{32}$  представляет собой D.
46. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 37-45, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-49, 63, 73, 74 и 78.
47. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем полипептид содержит петлю BC и петлю DE.
48. Полипептид согласно варианту осуществления 47, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, и петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45.
49. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-46, причем полипептид содержит петлю BC и петлю FG.
50. Полипептид согласно варианту осуществления 49, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.
51. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-46, причем полипептид содержит петлю DE и петлю FG.
52. Полипептид согласно варианту осуществления 51, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45, а петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.

53. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид содержит петлю BC, петлю DE и петлю FG.

54. Полипептид согласно варианту осуществления 53, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-38, петля DE содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-45, и петля FG содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-79.

55. Полипептид согласно варианту осуществления 54, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, петля DE содержит SEQ ID NO: 39, и петля FG включает последовательность SEQ ID NO: 75.

56. Полипептид согласно варианту осуществления 55, в котором последовательности петли BC содержат 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен; петля DE содержит 1 аминокислотную замену и петля FG содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен.

57. Полипептид согласно варианту осуществления 56, в котором

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

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

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

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

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

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

- (a)  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (b)  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L, M и V;
- (c)  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;
- (d)  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (e)  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (f)  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G и S;
- (g)  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (h)  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, L, M, S и T, и
- (i)  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y.

59. Полипептид согласно варианту осуществления 58, в котором:

- (a)  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;
- (b)  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;
- (c)  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;
- (d)  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (e)  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
- (f)  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;
- (g)  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W и Y;
- (h)  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, L, M и S; и
- (i)  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из C, H, N, Q, S и Y.

60. Полипептид согласно варианту осуществления 59, в котором:

- (a)  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из F, S и W;
- (b)  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L;

- (c)  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из P;
  - (d)  $X_{54}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;
  - (e)  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V и Y;
  - (f)  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G;
  - (g)  $X_{57}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;
  - (h)  $X_{58}$  выбирают из группы, состоящей из A, G и L; и
  - (i)  $X_{59}$  выбирают из группы, состоящей из H, N и Q.
61. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-60, в котором  $X_{51}$  представляет собой S.
62. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором  $X_{52}$  представляет собой L.
63. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором  $X_{53}$  представляет собой P.
64. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58, 59 и 61-63, в котором  $X_{54}$  представляет собой H.
65. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-64, в котором  $X_{55}$  представляет собой Q.
66. Полипептид согласно варианту осуществлению 58, в котором  $X_{56}$  представляет собой G.
67. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-66, в котором  $X_{57}$  представляет собой K.
68. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-67, в котором  $X_{58}$  представляет собой A.
69. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-68, в котором  $X_{59}$  представляет собой N.
70. Полипептид согласно варианту осуществления 58, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11-21, 23-31, 34 и 36-38.
71. Полипептид согласно варианту осуществления 70, в котором петля BC содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34.
72. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-71, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- $X_{60}$ , где  $X_{60}$  представляет собой A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V.
73. Полипептид согласно варианту осуществления 72, в котором  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M, Q, T и V.
74. Полипептид согласно варианту осуществления 73, в котором  $X_{60}$  представляет собой C, E, I, L, M и V.
75. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 72-74, в котором  $X_{60}$  представляет собой V.
76. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-75, в котором петля DE содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 и 42.
77. Полипептид согласно варианту осуществления 76, в котором петля DE содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.
78. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 58-77, в котором петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , где
- (a)  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y;
  - (b)  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (c)  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (d)  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (e)  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (f)  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;
  - (g)  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (h)  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (i)  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и
  - (j)  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.
79. Полипептид согласно варианту осуществления 78, в котором:
- (a)  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, I, L, M и V;
  - (b)  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, L, M, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (c)  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W и Y;
  - (d)  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (e)  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
  - (f)  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, P, T, V, W и Y;
  - (g)  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W и Y;
  - (h)  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
  - (i)  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из W и Y; и

- (j)  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T и V.
80. Полипептид согласно варианту осуществления 79, в котором:
- (a)  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из I и V;
  - (b)  $X_{62}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, L, M, T, V, W и Y;
  - (c)  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V;
  - (d)  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
  - (e)  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W;
  - (f)  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y;
  - (g)  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y;
  - (h)  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W;
  - (i)  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из W и Y; и
  - (j)  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.
81. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-80, в котором  $X_{61}$  представляет собой V.
82. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-81, в котором  $X_{62}$  представляет собой T.
83. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-82, в котором  $X_{63}$  представляет собой D.
84. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-83, в котором  $X_{64}$  представляет собой T.
85. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-84, в котором  $X_{65}$  представляет собой G.
86. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-85, в котором  $X_{66}$  представляет собой Y.
87. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-86, в котором  $X_{67}$  представляет собой L.
88. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-87, в котором  $X_{68}$  представляет собой K.
89. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-88, в котором  $X_{69}$  представляет собой Y.
90. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 78-89, в котором  $X_{70}$  представляет собой K.
91. Полипептид согласно варианту осуществления 1 или 2, в котором
- (a) петля BC содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{51}$ - $X_{52}$ - $X_{53}$ - $X_{54}$ - $X_{55}$ - $X_{56}$ - $X_{57}$ - $X_{58}$ - $X_{59}$ , где
    - (i)  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (ii)  $X_{52}$  выбирают из группы, состоящей из L, M и V;
    - (iii)  $X_{53}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V и Y;
    - (iv)  $X_{54}$  представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (v)  $X_{55}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (vi)  $X_{56}$  выбирают из группы, состоящей из G и S;
    - (vii)  $X_{57}$  представляет собой A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (viii)  $X_{58}$  представляет собой A, C, G, L, M, S и T; и
    - (ix)  $X_{59}$  представляет собой A, C, F, H, N, P, Q, R, S и Y;
  - (b) петля DE содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-R-G- $X_{60}$ , где  $X_{60}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, Q, S, T и V; и
  - (c) петля FG содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле  $X_{61}$ - $X_{62}$ - $X_{63}$ - $X_{64}$ - $X_{65}$ - $X_{66}$ - $X_{67}$ - $X_{68}$ - $X_{69}$ - $X_{70}$ , где
    - (i)  $X_{61}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, I, L, M, Q, T, V, W и Y;
    - (ii)  $X_{62}$  представляет собой A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (iii)  $X_{63}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (iv)  $X_{64}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (v)  $X_{65}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (vi)  $X_{66}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, F, H, I, L, M, N, P, S, T, V, W и Y;
    - (vii)  $X_{67}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (viii)  $X_{68}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y;
    - (ix)  $X_{69}$  выбирают из группы, состоящей из F, W и Y; и
    - (x)  $X_{70}$  выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W и Y.
92. Полипептид согласно варианту осуществления 91, в котором:
- (a) (i)  $X_{51}$  выбирают из группы, состоящей из C, F, I, S, V, W и Y;
  - (ii)  $X_{52}$  представляет собой L;
  - (iii)  $X_{53}$  представляет собой P;

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

93. Полипептид согласно варианту осуществления 92, в котором: (a) (i) X<sub>51</sub> выбирают из группы, состоящей из F, S и W;

- (ii) X<sub>52</sub> представляет собой L;
- (iii) X<sub>53</sub> представляет собой P;
- (iv) X<sub>54</sub> выбирают из группы, состоящей из C, F, G, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W и Y;
- (v) X<sub>55</sub> выбирают из группы, состоящей из A, C, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, и Y;
- (vi) X<sub>56</sub> представляет собой G;
- (vii) X<sub>57</sub> выбирают из группы, состоящей из A, C, H, K, L, M, N, R, V, W и Y;
- (viii) X<sub>58</sub> выбирают из группы, состоящей из A, G и L;
- (ix) X<sub>59</sub> выбирают из группы, состоящей из H, N и Q;
- (b) X<sub>60</sub> выбирают из группы, состоящей из C, E, I, L, M и V; и
- (c) (i) X<sub>61</sub> выбирают из группы, состоящей из I и V;
- (ii) X<sub>62</sub> представляет собой C, F, I, L, M, T, V, W и Y;
- (iii) X<sub>63</sub> выбирают из группы, состоящей из A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T и V;
- (iv) X<sub>64</sub> выбирают из группы, состоящей из A, C, D, F, G, I, L, M, N, Q, S, T, V, W и Y;
- (v) X<sub>65</sub> выбирают из группы, состоящей из A, G, S, T и W;
- (vi) X<sub>66</sub> выбирают из группы, состоящей из F, I, V, W и Y;
- (vii) X<sub>67</sub> выбирают из группы, состоящей из F, H, I, L, M, V, W и Y;
- (viii) X<sub>68</sub> выбирают из группы, состоящей из A, C, F, G, I, K, L, M, T, V и W;
- (ix) X<sub>69</sub> выбирают из группы, состоящей из W и Y; и
- (x) X<sub>70</sub> выбирают из группы, состоящей из A, G, K, L, M, P, Q и R.

94. Полипептид согласно варианту осуществления 92, в котором:

- (a) (i) X<sub>51</sub> представляет собой S;
- (ii) X<sub>52</sub> представляет собой L;
- (iii) X<sub>53</sub> представляет собой P;
- (iv) X<sub>54</sub> представляет собой H;
- (v) X<sub>55</sub> представляет собой Q;
- (vi) X<sub>56</sub> представляет собой G; и
- (vii) X<sub>57</sub> представляет собой K;
- (viii) X<sub>58</sub> представляет собой A; и
- (ix) X<sub>59</sub> представляет собой N;
- (b) X<sub>60</sub> представляет собой V; и
- (c) (i) X<sub>51</sub> представляет собой V;
- (ii) X<sub>62</sub> представляет собой T;
- (iii) X<sub>63</sub> представляет собой D;
- (iv) X<sub>64</sub> представляет собой T;
- (v) X<sub>65</sub> представляет собой G;
- (vi) X<sub>66</sub> представляет собой Y;
- (vii) X<sub>67</sub> представляет собой L;
- (viii) X<sub>68</sub> представляет собой K;
- (ix) X<sub>69</sub> представляет собой Y; и
- (x) X<sub>70</sub> представляет собой K.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

105. Полипептид согласно варианту осуществления 103, причем полипептид связывается с областью в пределах аминокислот 85-101.

106. Полипептид согласно варианту осуществления 103, причем полипептид связывается с областью в пределах аминокислот 85-101 и 56-66 в SEQ ID NO: 3.

107. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид не конкурирует за связывание с миостатином с ActRIIB.

108. Полипептид согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, причем полипептид конкурирует за связывание с миостатином с ALK4 и/или ALK5.

109. Полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащий один или несколько фармакокинетических (ПК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, Fc-фрагмента, трансферрина, сывороточного альбумина, связывающего сывороточный альбумин белка и связывающего сывороточный иммуноглобулин белка.

110. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент и полипептид связаны с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи, пептидной связи, полипептида, полимерного сахара или полиэтиленгликолевого фрагмента.

111. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент и полипептид связаны через линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 181-227.

112. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором связывающий сывороточный альбумин белок содержит десятый домен фибронектина типа III (<sup>10</sup>Fn3).

113. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором домен <sup>10</sup>Fn3 связывается с HSA.

114. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент представляет собой Fc.

115. Полипептид согласно варианту осуществления 114, в котором Fc находится на N-конце полипептида.

116. Полипептид согласно варианту осуществления 115, в котором Fc находится на C-конце полипептида.

117. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 114-116, причем полипептид образует димер.

118. Полипептид согласно варианту осуществления 109, в котором ПК фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль.

119. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

120. Композиция согласно варианту осуществления 118, причем композиция представляет собой по существу без эндотоксина.

121. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-116.

122. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 121, причем

молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124-167, 240-251 и 284-305.

123. Вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-116.

124. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-115.

125. Способ производства связывающего миостатин полипептида, включающий культивирование клетки согласно варианту осуществления 124 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида и очистки полипептида.

126. Способ ослабления или ингибирования связанного с миостатином заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому одному из вариантов осуществления 1-120.

127. Способ согласно варианту осуществления 126, при котором заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из: мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза, застойного обструктивного заболевания легких, хронической сердечной недостаточности, злокачественной опухоли, СПИД, почечной недостаточности, хронического заболевания почек, уремии, ревматоидного артрита, саркопении, мышечной слабости из-за длительного постельного режима, травмы спинного мозга, инсульта, перелома костей, старения, диабета, ожирения, гипергликемии, кахексии, остеоартрита, остеопороза, инфаркта миокарда и фиброза.

128. Способ ослабления или ингибирования нарушения, связанного с дегенерацией или атрофией мышц у субъекта, включающий введение эффективного количества полипептида или композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-120.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ние связывания полипептида с миостатином.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина типа III ( $^{10}\text{Fn3}$ ), который связывается с миостатином и содержит петли AB, BC, CD, DE, EF и FG, где петли BC, DE и FG содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 39 и 75 соответственно.
2. Полипептид по п.1, в котором домен  $^{10}\text{Fn3}$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331.
3. Полипептид по п.1 или 2, в котором домен  $^{10}\text{Fn3}$  дополнительно содержит N-концевую последовательность удлинения, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307.
4. Полипептид по п.1 или 2, в котором домен  $^{10}\text{Fn3}$  дополнительно содержит C-концевую последовательность удлинения, содержащую аминокислотную последовательность EI.
5. Полипептид по п.1 или 2, в котором домен  $^{10}\text{Fn3}$  дополнительно содержит N-концевую последовательность удлинения, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307, и C-концевую последовательность удлинения, содержащую аминокислотную последовательность EI.
6. Полипептид по п.5, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281.
7. Полипептид по п.1 или 2, дополнительно содержащий один или несколько фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, Fc-фрагмента, трансферрина, сывороточного альбумина, связывающего сывороточный альбумин белка и связывающего сывороточный иммуноглобулин белка.
8. Полипептид по п.7, где РК фрагмент и полипептид связаны через линкер с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 187.
9. Полипептид по п.7, в котором РК фрагмент представляет собой Fc.
10. Полипептид по п.9, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269.
11. Полипептид по п.9, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273.
12. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по п.1 или 2 и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по п.11 и фармацевтически приемлемый носитель.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по п.12 и фармацевтически приемлемый носитель.

```

1979 B06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 80)
2062 G02 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 81)
2522 C09 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 82)
2523 G06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 83)
2524 C11 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 84)
2524 D10 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 85)
2524 E09 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 86)
2524 H01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 87)
2524 H11 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 88)
2525 B01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 89)
2525 D02 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 90)
2525 D05 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 91)
2525 F07 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 92)
2987 A06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 93)
2987 B04 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 94)
2987 B09 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 95)
2987 C02 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 96)
2987 D05 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 97)
2987 E03 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 98)
2987 E08 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 99)
2987 F01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 100)
2987 F06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 101)
2987 G04 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 102)
2987 G09 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 103)
2987 H02 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 104)
2987 H07 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 105)
3006 A10 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 106)
3007 B08 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 107)
3007 C09 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 108)
3007 C10 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 109)
3008 A03 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 110)
3008 B08 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 111)
3008 D04 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 112)
3008 F01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 113)
3008 G01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 114)
3008 G03 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 115)
3115 D04 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 116)
3115 E06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 117)
3116 A07 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 118)
3116 A06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 119)
3116 C01 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 120)
3116 C02 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 121)
3116 H06 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 122)
3146 A08 MGVS DVPRLDLEVAATPTSLLSISWSPHAGHYNYYRITYGETGNSPVQEFVTV PGRGVATISGLKPGVDYITTVYAVTLTKSQMIIHYMPI SINRYTEIDKPSQNNHHHH (SEQ ID NO: 123)

```

Фиг. 1





Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



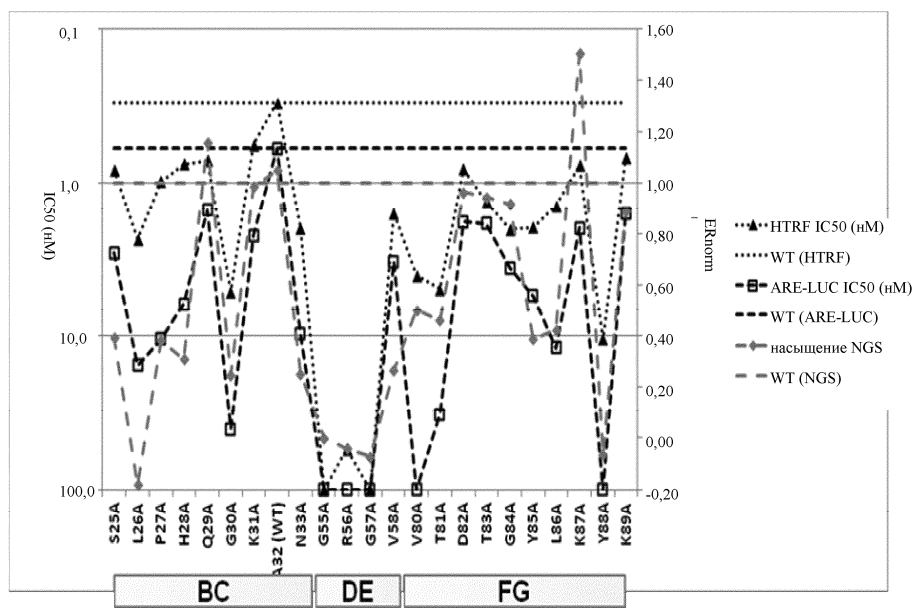
Фиг. 5



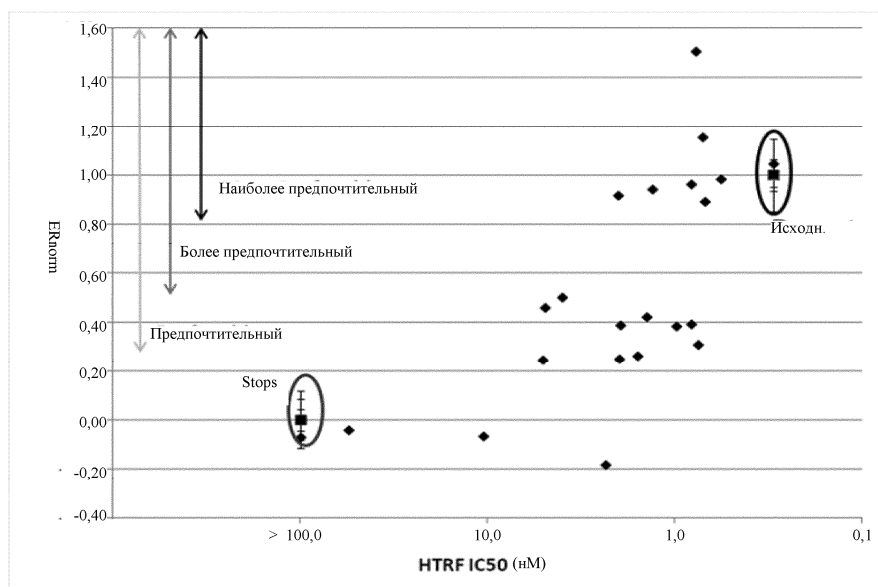
Фиг. 6



Фиг. 7

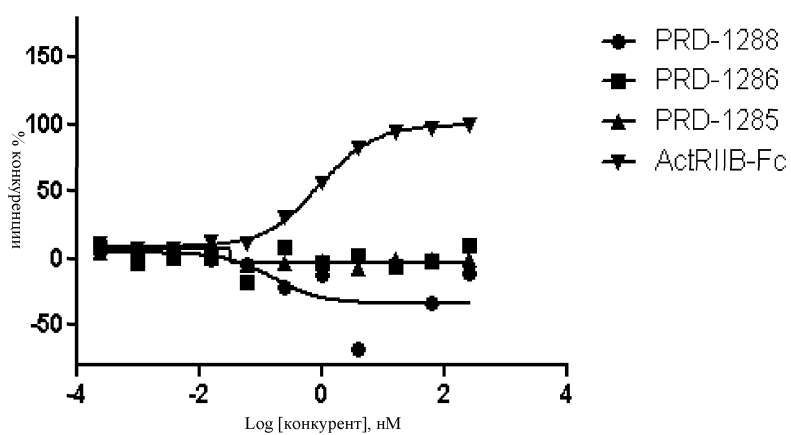


Фиг. 8



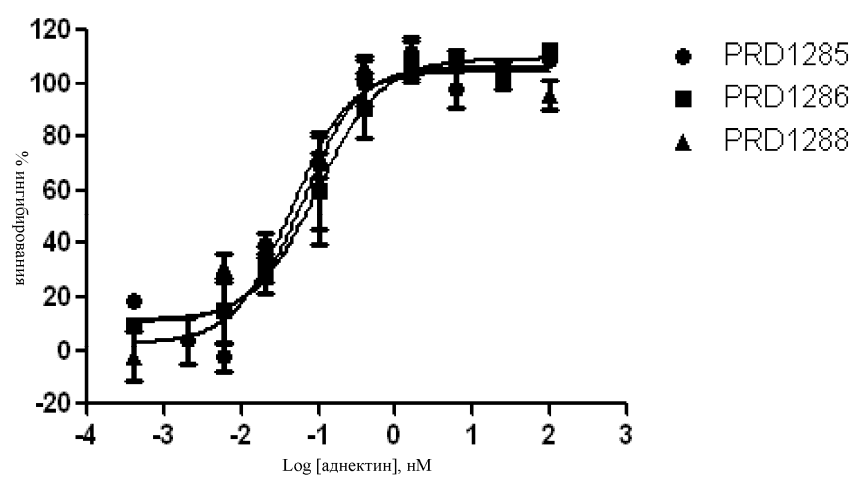
Фиг. 9

Конкурентный анализ ELISA миостатина ActRIIB

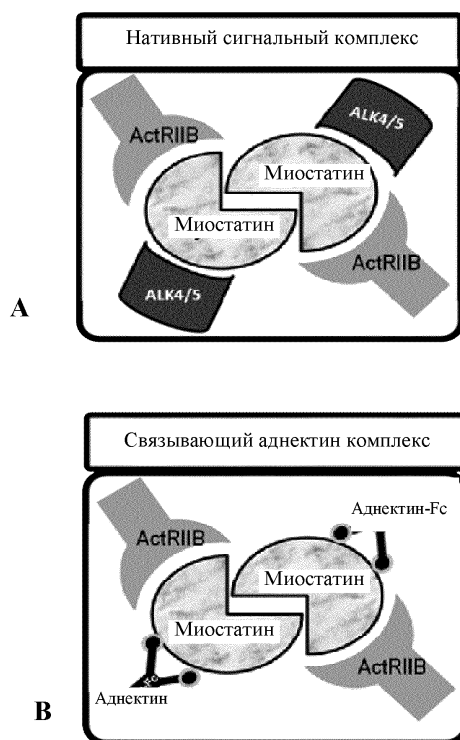


Фиг. 10

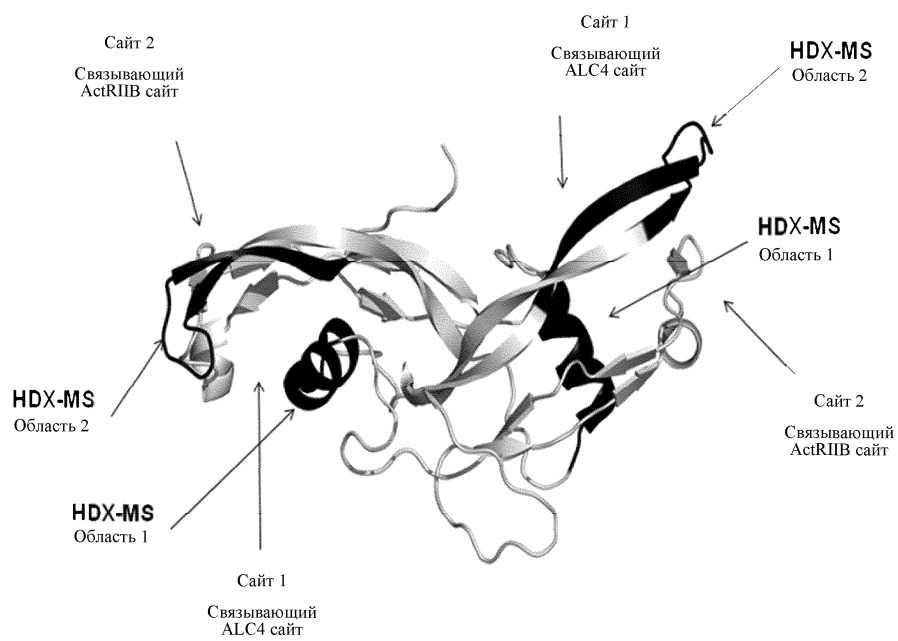
ARE-люц анализ\_миостатин



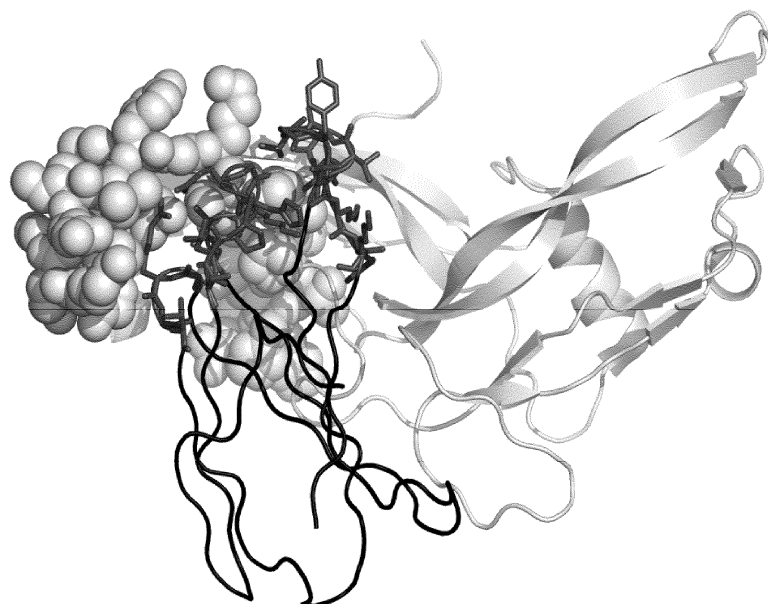
Фиг. 11



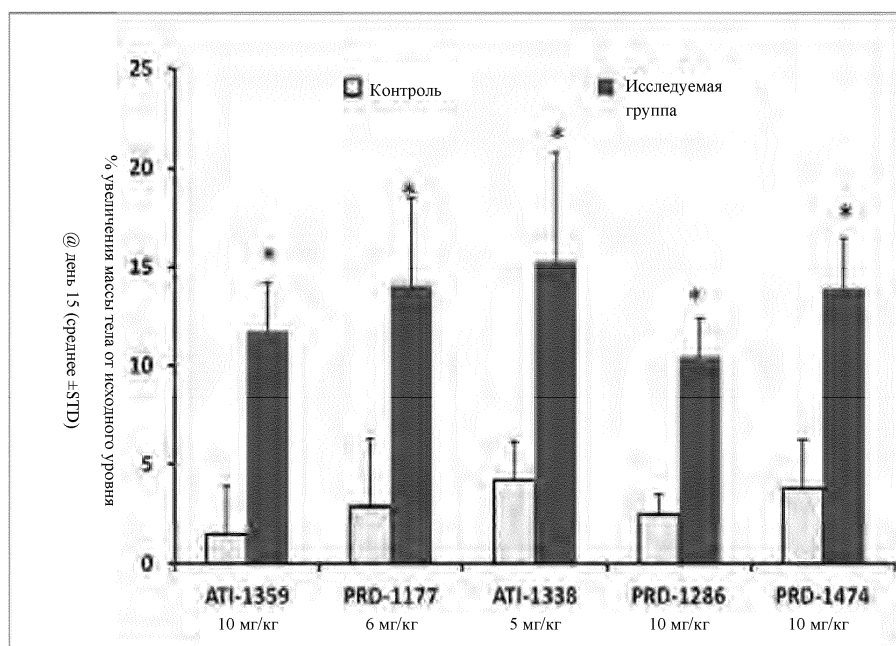
Фиг. 12



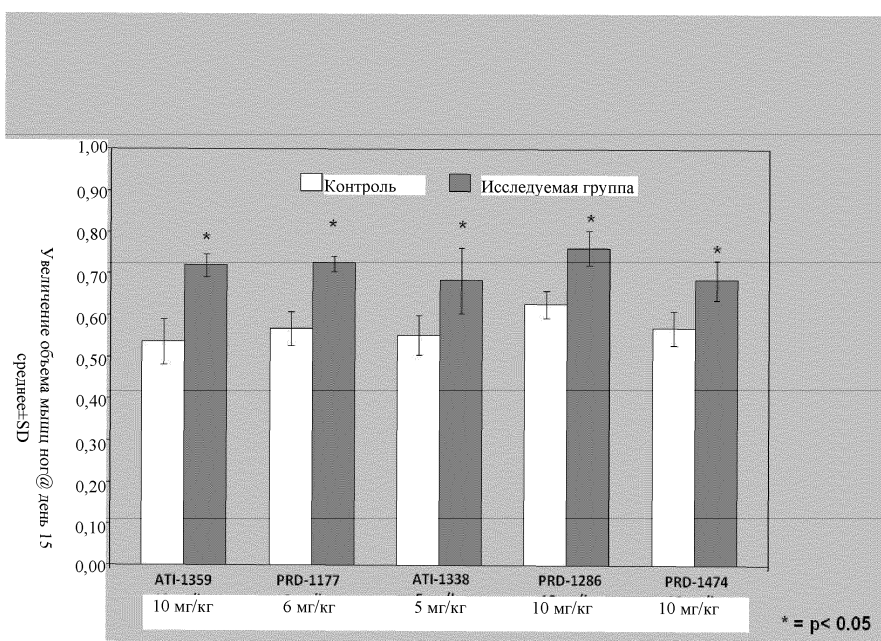
Фиг. 13А



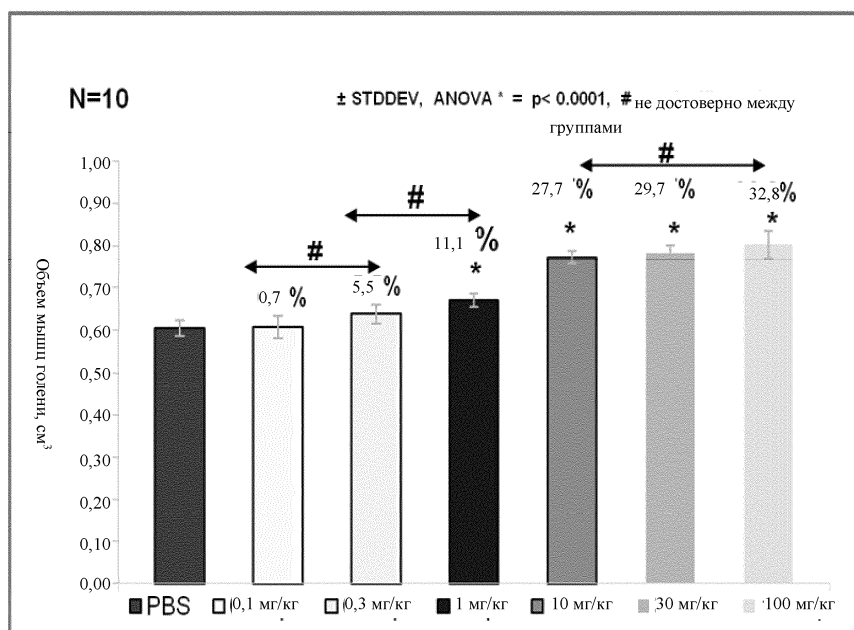
Фиг. 13В



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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