

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292863 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.09

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 16/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.29

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЙ БЕЛОК

(31) 20172168.5

(32) 2020.04.29

(33) EP

(86) PCT/EP2021/061329

(87) WO 2021/219818 2021.11.04

(71) Заявитель:  
ХОБЕР БИОТЕК АБ (SE)

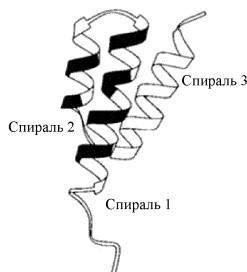
(72) Изобретатель:

Хобер София, Линдбо Сара, Вон  
Виттинг Эмма (SE)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В данном изобретении предложен биспецифический белок, позволяющий альбумину и нужной мишени одновременно связываться с молекулой ADAPT (производные от ABD Аффинные ПроТеины). В данном изобретении предложена молекула ADAPT, где предложенная поверхность связывания с нужной мишенью расположена на спирали 1 и спирали 2 молекулы ADAPT.



A1

202292863

202292863

A1

PCT/EP2021/061329

МПК: C07K 16/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01).01)

**БИСПЕЦИФИЧЕСКИЙ БЕЛОК****ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к области рекомбинантных биспецифических белков.

**ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Благодаря своей исключительной аффинности и специфичности к мишеням антитела оказались чрезвычайно успешными в фармацевтической индустрии. Действительно, на сегодняшний день шесть из десяти лекарственных препаратов, лидирующих по продажам на рынке, представляют собой антитела [1], и их суммарные продажи в конце 2017 г приближались к 100 миллиардам долларов США [2]. Несмотря на свою успешность, антитела не лишены недостатков. Их большой размер и сложная структура обуславливают высокую стоимость производства и не совсем оптимальную фармакокинетику при многих применениях в клинической практике. В связи с указанными недостатками и благодаря развитию и совершенствованию технологии белковой инженерии в последние десятилетия появились другие альтернативы. К ним относятся небольшие аффинные домены белков, известные под общим названием «альтернативные каркасы». Эти каркасы имеют несколько возможных преимуществ в качестве терапевтических средств и могут быть модифицированы так, чтобы приобрести высокую аффинность и специфичность к мишеням. Кроме того, их малый размер, определяющий как низкую стоимость товара, так и способность проникать в ткани, которые иначе недоступны, делает их привлекательной альтернативой антителам.

Помимо влияния на производственный процесс и биораспределение, другим потенциальным преимуществом небольшого размера является возможность использования альтернативных путей введения. Для крупных молекул, таких как антитела, возможности ограничены внутривенной и подкожной инъекцией, обе они доставляют большие неудобства пациенту и ложатся тяжелым бременем на систему здравоохранения [3]. Для альтернативных каркасов, имеющих гораздо меньший размер, в качестве неинвазивной альтернативы может служить назальная или легочная доставка, возможно повышающая удобство для пациентов и их комплаентность. Предыдущие исследования показали, что молекулярная масса и размер белка является наиболее важным фактором, влияющим на биодоступность лекарственных средств,

вводимых через слизистую оболочку, и, следовательно, поддержание минимального размера обретает особую важность [3, 4].

Малый размер также приводит к быстрому выведению из циркуляции, указанная характеристика может быть как преимуществом, так и недостатком, в зависимости от применения. Быстрое выведение из кровотока наряду с хорошим проникновением в ткани стали ключевыми для достижения высокой контрастности при визуализации молекул. Действительно, показано, что многие из альтернативных каркасов (например, Affibody, DARPin и ADAPT) являются перспективными зондами для визуализации, демонстрируя необычайную контрастность по отношению к здоровой окружающей ткани [5–7]. С другой стороны, в большинстве применений в терапевтических целях, быстрое выведение нежелательно, поскольку длительное время нахождения в кровотоке необходимо для осуществления введения в низких дозах и менее часто. Быстрое выведение обычно также приводит к нежелательному накоплению в почках. Для преодоления этих недостатков, обусловленных размером, было разработано несколько стратегий для увеличения времени полужизни в кровотоке. Одна из таких стратегий основана на слиянии с альбумин-связывающим доменом (ABD) белка G стрептококка. При использовании нековалентного связывания с собственным сывороточным альбумином пациента было продемонстрировано существенное увеличение времени полужизни и уменьшение накопления в почках для слитых каркасных белков, разработанных согласно такой стратегии [9–11]. Увеличение времени полужизни в циркуляции объясняется не только увеличением размера комплекса и, следовательно, способностью избежать фильтрации через гломерулярный барьер, но также и тем фактом, что альбумин избегает разрушения в лизосомах благодаря связыванию с неонатальным Fc рецептором, FcRn [12]. Несмотря на частое применение, одним препятствием для большинства существующих на сегодня стратегий увеличения времени полужизни является то, что они нивелируют некоторые преимущества, связанные с небольшим размером.

С целью разработки новой стратегии для увеличения времени полужизни без изменения размера молекулы группа исследователей, включая авторов данного изобретения, ранее создала сам ABD. В предыдущей работе в ABD внедрили новую связывающую поверхность, в дополнение к его собственному связыванию с альбумином. Путем рандомизации остатков в первой и третьей спирали ABD были

созданы биспецифические ADAPT (ABD Derived Affinity ProTeins, производные от ABD Аффинные ПроТеины) против домена Z<sub>2</sub> [13], TNF $\alpha$  [14], HER2 [15] и HER3 [16].

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения в предыдущей работе отмечали, что одновременное связывание альбумина и нужной мишени с молекулой ADAPT невозможно, вероятно из-за стерических препятствий. Поскольку концентрация альбумина в сыворотке высока (приблизительно 600 мкмоль) [17], даже низкая аффинность к нему наиболее вероятно предотвратит связывание этих молекул с мишенью *in vivo*.

Таким образом, задачей данного изобретения является предложение биспецифического белка, позволяющего альбумину и нужной мишени одновременно связываться с молекулой ADAPT. Задача решается путем разработки молекулы ADAPT, где предложенная поверхность связывания с нужной мишенью перемещена со спирали 1 и спирали 3 на спираль 1 и спираль 2 молекулы ADAPT.

Для решения по меньшей мере вышеупомянутой задачи в первом аспекте предложен биспецифический белок, способный связывать человеческий сывороточный альбумин (HSA) и другую мишень, где биспецифический белок содержит аминокислотную последовательность LAEAKVLANR X<sub>11</sub>LDKX<sub>15</sub>GX<sub>17</sub>SX<sub>19</sub>X<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LI X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>AKT VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>LX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID No. 1), где:

X<sub>11</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>19</sub>, X<sub>27</sub>, X<sub>33</sub>, X<sub>35</sub>, X<sub>36</sub>, X<sub>38</sub> и X<sub>39</sub> независимо друг от друга представляют собой любую аминокислоту;

X<sub>43</sub>, X<sub>44</sub>, X<sub>45</sub> и X<sub>46</sub> независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой любую аминокислоту;

X<sub>20</sub> представляет собой Y или F; X<sub>23</sub> представляет собой N, D или R;

X<sub>26</sub> представляет собой N или D; и X<sub>40</sub> представляет собой E или H;

при условии, что по меньшей мере одно из положений 22, 23 и 26 и по меньшей мере одно из положений 2, 3, 6, 7, 9, 10, 13 и 14 мутированы для достижения аффинности к указанной другой мишени.

Согласно одному воплощению по меньшей мере два из положений 22, 23 и 26 мутированы для достижения аффинности к указанной другой мишени.

Согласно одному воплощению все положения 22, 23 и 26 мутированы для достижения аффинности к указанной другой мишени.

Согласно одному воплощению по меньшей мере одно из положений 2, 9 и 13

мутированы для достижения аффинности к указанной другой мишени.

Согласно одному воплощению положение 9 мутировано для достижения аффинности к указанной другой мишени.

Согласно одному воплощению положение X<sub>27</sub> представляет собой N, K или D; и/или X<sub>33</sub> представляет собой G, E, S или D.

Согласно одному воплощению X<sub>36</sub> представляет собой D, A, S, E или K.

Согласно одному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15, 19-26 и/или 31-44 не представляет собой C.

Согласно одному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15 и/или 19-26 не представляет собой G.

Согласно одному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15, 19-26 и/или 31-44 не представляет собой P.

Согласно одному воплощению каждое из положений 1, 4, 5, 8, 12, 16, 25, 31, 34 и 42 независимо является консервативным или консервативно замещено.

Согласно второму аспекту предложен полинуклеотид, кодирующий биспецифический белок по любому из воплощений первого аспекта.

Согласно третьему аспекту предложена экспрессирующая кассета, содержащая полинуклеотид по второму аспекту.

Согласно четвертому аспекту предложен вектор, содержащий полинуклеотид по второму аспекту или экспрессирующую кассету по третьему аспекту.

Согласно пятому аспекту предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический белок по любому из воплощений первого аспекта.

Согласно одному воплощению пятого аспекта фармацевтическая композиция дополнительно содержит молекулу-мишень, ассоциированную, связанную или присоединенную к биспецифическому белку.

Согласно одному воплощению молекула-мишень выбрана из группы, содержащей фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), простатспецифический антиген (PSA), С-реактивный белок (CRP), ренин (REN), ангиогенин (ANG), миелоидный фактор роста (MYDGF) и инсулин.

Согласно одному воплощению пятого аспекта фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент, стабилизатор, добавку, буферный раствор и/или растворитель.

Согласно шестому аспекту предложено терапевтический агент, содержащий биспецифический белок по любому из воплощений первого аспекта и цитотоксический агент, такой как цитотоксическая молекула, пептид, белок или радиоактивный изотоп.

Согласно одному воплощению шестого аспекта цитотоксический агент представляет собой алкилирующее лекарственное средство, антрациклин, антиметаболит, алкалоид барвинка, этопозид, противоопухолевое лекарственное средство или вещество, экзотоксин, белок, инактивирующий рибосому, или ингибитор протеинкиназы.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A иллюстрирует строение нового биспецифического белка с рандомизированными положениями, показанными черным. Фиг. 1B иллюстрирует связывающую поверхность, показанную черным, ранее опубликованных биспецифических связующих, имеющих стерические препятствия для одновременного связывания HSA и других мишеней. Фиг. 1C описывает связывание с HSA, показанное черным. Фиг. 1D описывает последовательность родительской молекулы ABD035 и рандомизированные положения по данному изобретению, отмеченные черными точками.

Фиг. 2 описывает способность биспецифических белков по данному изобретению одновременно связывать HSA и мишень. На Фиг. 2A показаны сенсограммы ADAPT<sub>Insulin\_02</sub>, полученные методом SPR, демонстрирующие связывание с инсулином и HSA, но не с нерелевантной мишенью Her2. На Фиг. 2B показан тот же самый анализ, но при насыщении ADAPT<sub>Insulin\_02</sub> при помощи HSA, демонстрирующий, что он по-прежнему способен связываться с инсулином, но не с HSA.

На Фиг. 3 показаны спектры кругового дихроизма отдельных вариантов ADAPT до (черная линия) и после (черный пунктир) тепловой денатурации. A) ADAPT\_CRP\_09; B) ADAPT\_CRP\_23; C) ADAPT\_CRP\_38; D) ADAPT\_CRP\_40; E) ADAPT\_insulin\_01; F) ADAPT\_insulin\_02; G) ADAPT\_insulin\_03; H) ADAPT\_TNF\_05; I) ADAPT\_TNF\_09; J) ADAPT\_PSA\_01; K) ADAPT\_PSA\_05; L) ADAPT\_REN\_01; M) ADAPT\_REN\_40; N) ADAPT\_ANG\_02; O) ADAPT\_ANG\_06; P) ADAPT\_ANG\_13; Q) ADAPT\_ANG\_16; R) ADAPT\_MYDGF\_07; S) ADAPT\_MYDGF\_08

На Фиг. 4 представлена оценка олигомерного состояния по SEC-хроматограмме, где показано наложение отдельных вариантов ADAPT (черная линия) на калибратор (черный пунктир). A) ADAPT\_CRP\_09; B) ADAPT\_CRP\_23; C) ADAPT\_CRP\_38; D)

ADAPT\_CRP\_40; E) ADAPT\_insulin\_01; F) ADAPT\_insulin\_02; G) ADAPT\_insulin\_03; H) ADAPT\_TNF\_05; I) ADAPT\_TNF\_09; J) ADAPT\_PSA\_01; K) ADAPT\_PSA\_05; L) ADAPT\_REN\_01; M) ADAPT\_REN\_40; N) ADAPT\_ANG\_02; O) ADAPT\_ANG\_06; P) ADAPT\_ANG\_13; Q) ADAPT\_ANG\_16; R) ADAPT\_MYDGF\_07; S) ADAPT\_MYDGF\_08.

На Фиг. 5 представлена оценка одновременного связывания путем исследования захвата методом SPR. Сенсограммы вариантов ADAPT, полученные методом SPR, указывающие на одновременное связывание HSA и мишени, демонстрирующие кривые связывания для инжектированной мишени после захвата на поверхности с иммобилизованным HSA. A) ADAPT\_insulin\_01; B) ADAPT\_insulin\_02; C) ADAPT\_insulin03; D) ADAPT\_TNFa\_05; E) ADAPT\_TNFa\_09; F) ADAPT\_PSA\_01; G) ADAPT\_PSA\_05; H) ADAPT\_MYDGF\_07; I) ADAPT\_MYDGF\_08; J) ADAPT\_ANG\_02; K) ADAPT\_ANG\_06; L) ADAPT\_ANG\_13; M) ADAPT\_ANG\_16.

На Фиг. 6 показано образование третичного комплекса на примере ADAPT\_инсулин\_02. SEC-хроматограмма с наложенными сигналами инжектированных по-отдельности HSA, ADAPT\_Ins02 и инсулина, а также образца с инсулином и ADAPT\_Ins02, образца с HSA и ADAPT\_Ins02 и образца со всеми тремя партнерами по связыванию.

На Фиг. 7 показано выравнивание известных альбумин-связывающих последовательностей.

### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

“ABD” означает альбумин-связывающий домен.

“HSA” означает человеческий сывороточный альбумин.

Биспецифический белок в данном изобретении также обозначается термином “ADAPT”, сокращенного обозначения для производных от ABD Аффинных ПроТеинов, или термином “связующее”.

«Мишень» в данном документе обозначает молекулу-мишень, которая будет связываться с биспецифическим белком, и указанная молекула будет эффекторной молекулой в комплексе биспецифического белка, связанного с указанной мишенью и HSA.

Для аминокислот используются следующие сокращения: Аланин – A; Аргинин – R; Аспарагин – N; Аспарагиновая кислота – D; Цистеин – C; Глутаминовая кислота – E; Глутамин – Q; Глицин – G; Гистидин – H; Изолейцин – I; Лейцин – L;

Лизин – К; Метионин – М; Фенилаланин – F; Пролин – Р; Серин – S; Треонин – Т; Триптофан – W; Тирозин – Y; Валин – V.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Небольшой размер является привлекательной характеристикой белков терапевтического назначения, поскольку он обеспечивает хорошее проникновение в ткани и неинвазивные пути введения, а также удобство и экономичность производства. Однако, зачастую преимущества сопровождаются недостатками. Эти небольшие белки, как правило, имеют ограниченное время полужизни *in vivo*, что обуславливает существенную абсорбцию почками, а также пониженную терапевтическую эффективность. Хорошо известная стратегия преодоления этих ограничений заключается в использовании длительного времени полужизни человеческого сывороточного альбумина за счет непосредственного слияния либо с самим альбумином, либо с различными альбумин-связывающими группировками. Предыдущие исследования показали, что слияние молекул терапевтического назначения с ABD, происходящим из белка G стрептококка, приводит к существенному снижению абсорбции почками и существенно увеличивает время полужизни [10,23].

В исследовании, лежащем в основе данного изобретения, использовали альбумин-связывающие свойства ABD, но вместо его слияния с другим связующим в саму молекулу внедряли дополнительный сайт связывания. Таким образом, создали небольшие однодоменные биспецифические связующие с улучшенными фармакокинетическими свойствами. Для этого создали новую комбинаторную библиотеку фагового дисплея и использовали для отбора молекул с целью одновременного связывания HSA и других клинически значимых мишеней.

Ранее подтвердили возможность внедрения в данный каркас двух связывающих детерминант [13–16]. Однако, в этих исследованиях связывание одного из партнеров предотвращало одновременное связывание другого. Авторы данного изобретения предположили, что это может быть обусловлено стерическими препятствиями и поэтому сконструировали библиотеку, описанную в данном изобретении, с новой связывающей поверхностью на противоположной стороне молекулы (см. Фиг. 1). Это оказалось успешной стратегией, поскольку позволило получить несколько биспецифических молекул, демонстрирующих одновременное связывание.

Таким образом, авторы данного изобретения создали новую комбинаторную библиотеку, где предложенную связывающую поверхность переместили на спирали 1 и

2 ABD. Гипотеза заключалась в том, что библиотека нового дизайна повысит возможность создания минимальных белков, способных одновременно связывать альбумин и другие мишени, тем самым объединяя преимущества как небольших, так и крупных молекул терапевтического назначения в едином формате. Для демонстрации качества и применимости этой новой комбинаторной библиотеки провели отбор при помощи фагового дисплея с использованием панели клинически релевантных мишеней различного размера (TNF $\alpha$ , PSA, CRP, REN, ANG, MYDGF и инсулина). Кроме того, разработали стандартизированный технологический процесс, включающий секвенирование нового поколения и метод на основе ПЦР для восстановления гена, обеспечивающие экономичное выделение клонов, связывающих мишени. Результаты данного исследования показали, что новая связывающая поверхность оказалась подходящей для взаимодействия с мишенью и также обеспечивала одновременное связывание с альбумином сыворотки.

Таким образом, предложен биспецифический белок, способный одновременно связывать человеческий сывороточный альбумин (HSA) и другую мишень. Этот биспецифический белок содержит аминокислотную последовательность LAEAKVLNR X<sub>11</sub>LDKX<sub>15</sub>GX<sub>17</sub>SX<sub>19</sub>X<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LI X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>AKT VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>LX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID No. 1). В указанной последовательности X<sub>11</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>19</sub>, X<sub>27</sub>, X<sub>33</sub>, X<sub>35</sub>, X<sub>36</sub>, X<sub>38</sub> и X<sub>39</sub> независимо друг от друга представляют собой любую аминокислоту. X<sub>43</sub>, X<sub>44</sub>, X<sub>45</sub> и X<sub>46</sub> независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой любую аминокислоту. X<sub>20</sub> представляет собой Y или F. X<sub>23</sub> представляет собой N, D или R. X<sub>26</sub> представляет собой N или D. X<sub>40</sub> представляет собой E или H. По меньшей мере одно из положений 22, 23 и 26 и по меньшей мере одно из положений 2, 3, 6, 7, 9, 10, 13 и 14 в вышеупомянутой последовательности мутированы для достижения аффинности к другой мишени.

Положения аминокислот, обсуждающихся в данном документе применительно к биспецифическому белку, указаны согласно SEQ ID No. 1. Например, когда обсуждается мутация аминокислоты в положении 2, она относится к аминокислоте в положении 2 SEQ ID No. 1; когда обсуждается мутация аминокислоты в положении 3, она относится к аминокислоте в положении 3 SEQ ID No. 1; когда обсуждается мутация аминокислоты в положении 22, она относится к аминокислоте в положении 22 SEQ ID No. 1 и так далее. Белок с SEQ ID No. 1 может быть внедрен в более крупный комплекс с дополнительными аминокислотами либо в С-концевом, либо в N-концевом

направлении относительно SEQ ID No. 1. Однако, положения аминокислот, обсуждающихся в данном документе, всегда указываются относительно SEQ ID No. 1, как объясняется выше. SEQ ID No. 1 основана на выравнивании известных связующих альбумина, показанных на Фиг. 7, и понимании авторами изобретения влияния, оказываемого аминокислотами в различных положениях, на связывание и стабильность.

Биспецифический белок, описанный выше, содержит в структуре три спирали, где аминокислоты 1-15 образуют спираль 1, аминокислоты 19-26 образуют спираль 2 и аминокислоты 31-44 образуют спираль 3. Таким образом, любая мутация по меньшей мере в одном из положений 22, 23 и 26 расположена в спирали 2, и любая мутация по меньшей мере в одном из положений 2, 3, 6, 7, 9, 10, 13 и 14 расположена в спирали 1. Положения 2, 3, 6, 7, 9, 10, 13 и 14 образуют связывающую мишень поверхность спирали 1, и положения 22, 23 и 26 образуют связывающую мишень поверхность спирали 2.

Путем внедрения рандомизированных мутаций в определенные аминокислотные положения в спиральях 1 и 2 и последующего отбора по указанным выше мишеням, авторы изобретения идентифицировали определенные положения аминокислот, которые особенно важны для мутации для достижения аффинности к выбранной мишени, при этом сохраняя стабильность белка и обеспечивая возможность одновременного связывания с HSA. Определенные аминокислотные положения расположены таким образом, что сайт связывания с мишенью не будет стерически препятствовать связыванию с HSA. См. Фиг. 1, где четко показано, что указанные определенные аминокислотные положения, подвергнутые мутациям, направлены к противоположной стороне белка относительно сайта связывания с HSA.

Кроме того, указанные определенные аминокислотные положения расположены таким образом, что они не затрагивают или не нарушают стабильность белка.

Согласно одному предпочтительному воплощению по меньшей мере два из положений 22, 23 и 26 мутированы для достижения аффинности к другой мишени. Например, могут быть мутированы положения 22 и 26 или положения 22 и 23 или положения 23 и 26. Согласно другому предпочтительному воплощению все положения 22, 23 и 26 мутированы для достижения аффинности к другой мишени.

Согласно одному предпочтительному воплощению по меньшей мере одно из положений 2, 9 и 13 мутированы для достижения аффинности к другой мишени.

Согласно еще одному предпочтительному воплощению положение 9 мутировано для достижения аффинности к другой мишени.

Согласно одному воплощению положение  $X_{27}$  представляет собой N, K или D. Согласно одному воплощению  $X_{33}$  представляет собой G, E, S или D. Согласно еще одному воплощению  $X_{36}$  представляет собой D, A, S, E или K.

Согласно одному предпочтительному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15, 19-26 и/или 31-44 не представляет собой C. C представляет собой аминокислоту, образующую дисульфид, и поэтому неуместна, поскольку нежелательная дисульфидная связь будет негативно влиять на общую структуру такого небольшого белка.

Согласно одному предпочтительному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15 и/или 19-26 не представляет собой G. G представляет собой очень гибкую аминокислоту. Повышенная гибкость может негативно влиять на структуру спирали.

Согласно одному предпочтительному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15, 19-26 и/или 31-44 не представляет собой P. P обладает очень жесткой структурой, имеет свойства, нарушающие спираль, и поэтому нежелательна для частей белка, образующих спиральные структуры.

Согласно одному предпочтительному воплощению ни одна из аминокислот в положениях 1-15, 19-26 и/или 31-44 не представляет собой ни C, ни G, ни P.

Согласно одному воплощению каждая из аминокислот в положениях 1, 4, 5, 8, 12, 16, 25, 31, 34 и 42 независимо является консервативной или консервативно замещенной. Предпочтительно, аминокислоты в положениях 1, 4, 5, 8, 12, 16, 25, 31, 34 и 42 являются консервативными. Указанные положения важны для стабильности белка и, следовательно, не должны быть мутированы, или, в альтернативном варианте, содержат только консервативные мутации, чтобы сохранять и не нарушать структуру и стабильность белка.

Консервативные замены представляют собой аминокислотные замены, которые меняют заданную аминокислоту на другую аминокислоту со схожими физико-биохимическими свойствами. Как правило, консервативной заменой V может быть A или F; консервативной заменой I может быть F или C; консервативной заменой L может быть F или V; консервативной заменой M может быть F или V; консервативной заменой F может быть L или M; консервативной заменой C может быть V или M; и

консервативной заменой W может быть F или L.

В данном изобретении авторы более подробно изучили биспецифический белок согласно вышеизложенному, мутированный для большей аффинности к мишеням, выбранным из группы, содержащей фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), простата-специфический антиген (PSA), С-реактивный белок (CRP), ренин (REN), ангиогенин (ANG), миелоидный фактор роста (MYDGF) и инсулин. При изучении вариантов биспецифического белка, мутированных для связывания с вышеупомянутыми мишенями, в положениях, указанных ниже в Таблице 1, были обнаружены следующие аминокислоты.

*Таблица 1. Выравнивание мутированных положений в новых связующих*

**Положение**

| <b>аминокислоты</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>13</b> | <b>14</b> | <b>22</b> | <b>23</b> | <b>26</b> |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| TNF $\alpha$ _05    | I        | W        | A        | E        | V        | Q         | F         | M         | Y         | D         | I         |
| TNF $\alpha$ _09    | I        | W        | A        | S        | V        | R         | H         | R         | Y         | E         | V         |
| CRP_09              | R        | V        | S        | M        | W        | H         | W         | S         | L         | R         | D         |
| CRP_23              | S        | K        | A        | Q        | W        | H         | Y         | Y         | L         | S         | D         |
| CRP_38              | K        | V        | I        | I        | F        | H         | W         | E         | L         | S         | D         |
| CRP_48              | H        | Y        | I        | M        | F        | H         | W         | Q         | L         | Q         | D         |
| PSA_01              | T        | V        | F        | W        | L        | T         | Q         | E         | A         | N         | T         |
| PSA_05              | F        | R        | V        | W        | V        | W         | D         | Q         | D         | E         | W         |
| REN_01              | Y        | H        | W        | M        | S        | L         | A         | K         | W         | N         | S         |
| REN_40              | M        | W        | A        | E        | A        | I         | V         | D         | Q         | Y         | S         |
| ANG_02              | Y        | W        | D        | Y        | D        | Y         | W         | Q         | R         | S         | W         |
| ANG_06              | W        | A        | D        | D        | D        | W         | W         | Q         | R         | A         | W         |

|          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ANG_13   | H | E | D | W | D | Y | W | S | R | A | W |
| ANG_16   | Y | V | D | N | D | W | W | Q | R | S | W |
| MYDGF_07 | W | W | V | W | V | A | Q | K | F | K | D |
| MYDGF_08 | W | W | V | S | I | K | Q | A | Y | M | T |
| INS_01   | V | I | A | Y | Q | Y | A | F | S | D | K |
| INS_02   | A | I | A | Y | Q | Y | S | F | R | E | V |
| INS_03   | A | V | A | Y | K | Y | A | F | N | E | L |

Таким образом, очевидно, что аминокислотные мутации в положениях, непосредственно указанных выше, различаются в зависимости от мишени. Также очевидно, что мутации, направленные на одну и ту же мишень, обладают большим сходством и многими общими признаками в отношении типа аминокислоты в определенном положении или даже нахождения такой же аминокислоты в определенном положении. Это четко подтверждает, что указанные аминокислотные положения, подлежащие мутации в биспецифическом белке по данному изобретению для повышенной аффинности к мишени, действительно имеют важное значение. Указанные аминокислотные положения, подлежащие мутации в биспецифическом белке по данному изобретению, представляют собой «горячие точки» для мутации для решения задач данного изобретения. Характеризация вышеупомянутых идентифицированных мутантов приведена ниже в Таблице 3 в разделе Результаты.

В данном изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий биспецифический белок по любому из воплощений первого аспекта. Последовательность полинуклеотида может быть оптимизирована по составу кодонов для экспрессии в подходящем организме или системе экспрессии.

В данном изобретении также предложена экспрессирующая кассета, содержащая полинуклеотид, указанный выше. Экспрессирующая кассета содержит полинуклеотид, описанный выше, в открытой рамке считывания (ORF), промотор и 3'

нетранслируемую область, где указанная область возможно представляет собой сайт полиаденилирования. Промотор выбран таким образом, чтобы он обеспечивал экспрессию в подходящем организме или системе экспрессии. Экспрессирующая кассета может содержать дополнительные регуляторные последовательности.

Кроме того, предложен вектор, содержащий полинуклеотид, согласно описанию выше, или экспрессирующую кассету согласно описанию выше. Вектор может дополнительно содержать подходящие промоторы, метки, детектируемые маркеры и/или другие регуляторные последовательности, контролирующие репликацию и/или экспрессию вектора в подходящем организме или системе экспрессии.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический белок по любому из воплощений, указанных выше.

Согласно одному воплощению молекула-мишень выбрана из группы, содержащей фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), простатспецифический антиген (PSA), С-реактивный белок (CRP), ренин (REN), ангиогенин (ANG), миелоидный фактор роста (MYDGF) и инсулин.

Согласно одному воплощению фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент, стабилизатор, добавку, буферный раствор и/или растворитель.

Фармацевтическая композиция предпочтительно предназначена для назального или легочного введения. Как обсуждалось выше в разделе «Предшествующий уровень техники», размер молекулы или белка имеет важное значение для его введения, при этом меньший размер позволяет использовать другие пути введения по сравнению с большим размером. Раскрытый в данном документе биспецифический белок является небольшим, приблизительно 6 кДа, и, следовательно, подходит для введения назальным или легочным путем. При назальном введении биспецифический белок по данному изобретению может быстро проходить через одбу слой эпителиальных клеток в слизистой оболочке назальной полости и попадать непосредственно в системный кровоток. Это обеспечивает быстрое начало действия вводимого фармацевтического средства. Кроме того, назальное введение является простым, неинвазивным и комфортабельным для субъекта, которого лечат или которому вводят фармацевтическую композицию. Таким образом, фармацевтическая композиция предпочтительно может быть составлена в виде раствора, суспензии или порошка для распыления или закапывания в нос и носовую полость. Такие фармацевтические

составы обычно могут, помимо компонентов, упомянутых выше применительно к фармацевтической композиции, содержать солюбилизатор, буферный компонент, антиоксидант, увлажняющее вещество, желирующий/придающий вязкость агент и корригент вкуса и/или запаха.

В данном изобретении также предложено терапевтический агент, содержащий биспецифический белок по любому из указанных выше воплощений и цитотоксический агент, такой как цитотоксическая молекула, пептид, белок или радиоактивный изотоп.

Согласно одному воплощению цитотоксический агент представляет собой алкилирующее лекарственное средство, антрациклин или другой цитотоксический антибиотик, антиметаболит, алкалоид барвинка, этопозид, противоопухолевое лекарственное средство или вещество, экзотоксин, белок, инактивирующий рибосому, или ингибитор протеинкиназы.

Примерами алкилирующего лекарственного средства являются бендамустин, бусульфан, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, ломустин, мелфалан, тиотепа и тресульфан.

Примерами антрациклинов и других цитотоксических антибиотиков являются блеомицин, калихеамицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митомицин и митоксантрон.

Примерами антиметаболитов являются азациитидин, капецитабин, кладрибин, клофарабин, цитарабин, флударабин, фторурацил, гемцитабин, меркаптопурин, метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед и тиогуанин.

Примерами алкалоидов барвинка являются винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

Примерами противоопухолевых лекарственных средств или веществ являются  $\alpha$ -амантин, амсакрин, бексаротен, бортезомиб, карбоплатин, цетуксимаб, цисплатин, кризантаспаза, криптофицины, дакарбазин, доцетаксел, гидроксикарбамид (гидроксимочевина), иринотекан, мертанзин (эмтанзин), монометил ауристатин Е, монометил ауристатин F, оксалиплатин, паклитаксел, пентостатин, прокарбазин, равтанзин (соравтанзин), ризоксин, темозоломид, топотекан, тубулизин, трастузумаб и третиноин.

Примерами экзотоксинов являются дифтерийный токсин, экзотоксин А псевдомонад и cholix-токсин.

Примерами белков, инактивирующих рибосому, являются абрин, битин, буганин, гелонин, рицин, сапонин, шига-токсин, белки спироплазмы, спортин и трихосантин.

Примерами ингибиторов протеинкиназ являются дасатиниб, эрлотиниб, эверолимус, иматиниб, нилотиниб и сунитиниб.

Согласно одному воплощению цитотоксический радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{58\text{m}}\text{Co}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$  и  $^{211}\text{At}$ .

В одном воплощении радиоактивный изотоп представляет собой радиоактивный металл, а биспецифический белок конъюгирован с радиоактивным металлом посредством хелатора, который ковалентно связан с биспецифическим белком, предпочтительно с остатком С биспецифического белка. Соответственно, воплощение биспецифического белка дополнительно содержит концевой цистеиновый остаток С, предпочтительно С-концевой остаток С. Концевой остаток С предпочтительно является единственным остатком С биспецифического белка. Указанный концевой остаток С предпочтительно расположен в С-концевом направлении относительно SEQ ID No. 1, и, следовательно, не входит в SEQ ID No. 1.

Хелатор может быть выбран из группы, состоящей из додекан-тетрауксусной кислоты (DOTA) и ее производных (например, малеимидного производного DOTA), макроциклических хелаторов с поперечными мостиками и стерически ограниченных ациклических хелаторов.

Особенно подходящими хелаторами для  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{227}\text{Th}$  и  $^{58\text{m}}\text{Co}$  являются DOTA и ее производное DOTAGA.

Для  $^{67}\text{Cu}$  и  $^{64}\text{Cu}$  наилучшим выбором является хелатор с поперечным мостиком, такой как CB-TE2A.

Для  $^{188}\text{Re}$  и  $^{186}\text{Re}$  предпочтителен хелатор на основе цистеина или меркаптоацетил-содержащего пептида.

$^{131}\text{I}$ ,  $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$  и  $^{211}\text{At}$  представляют собой радиоактивные изотопы, не являющиеся металлами, которые могут быть связаны с биспецифическим белком посредством ковалентного конъюгирования.

Мечение радиоактивным йодом может быть осуществлено с использованием ((4-гидроксифенил)этил)малеимида (НРЕМ), который может быть связан с остатком С биспецифического белка.  $^{76}\text{As}$  и  $^{77}\text{As}$  (и  $^{74}\text{As}$ ) в форме As (III) могут быть

непосредственно присоединены к (свеже) восстановленной тиоловой группе остатка С биспецифического белка.

В качестве линкера для присоединения  $^{211}\text{At}$  может использоваться N-[4-(три-н-бутилстаннил)фенетил]-малеимид. В этом случае  $^{211}\text{At}$  сначала присоединяют к линкеру посредством астатодестаннирования с образованием 4-астато-фенетил-малеимида (AtPEM), который в свою очередь может быть присоединен к остатку цистеина (C) слитого белка.

### ПРИМЕРЫ - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### **Конструирование библиотеки фагового дисплея**

Фагмидный вектор (pSE) конструировали на основе фагмиды pAffi1 [18]. В pSE генный фрагмент, кодирующий спираль 3 белка Z, присутствующий в pAffi1, был удален, а генный фрагмент, кодирующий ABDwt, был заменен, чтобы вместо этого кодировать полноразмерный белок Z. Фагмиду pSE заказывали в Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Регенсбург, Германия). Сайты распознавания рестрикционных ферментов *XhoI* и *NheI*, расположенные в направлении против хода транскрипции относительно Zwt, использовали для последующей вставки кассеты с библиотекой генов.

Первую библиотеку генов ADAPT собирали из трех отдельных олигонуклеотидов: fwdABDlib\_h1 (SEQ ID No. 2), охватывающего спираль 1 и содержащего восемь диверсифицированных положений, способных кодировать все аминокислоты, за исключением Pro, Cys и Gly (Ella Biotech, Мартинсрид, Германия), revABDlib\_h2 (SEQ ID No. 3), охватывающего спираль 2 и содержащего три положения, диверсифицированные вследствие вырожденности NNK (TAG Copenhagen, Copenhagen, Denmark), и revABDlib\_h3 (SEQ ID No. 4), охватывающего спираль 3 без каких-либо диверсифицированных положений (TAG Copenhagen, Копенгаген, Дания). Вторую версию библиотеки собирали путем замены revABDlib\_h2 (SEQ ID No. 3) на revABDlib\_h2\_v2 (SEQ ID No. 5) (Ella Biotech, Мартинсрид, Германия), с теми же положениями, но при этом диверсифицированными таким образом, чтобы кодировать все аминокислоты, за исключением Pro, Cys и Gly, как и в случае спирали 1. Полные последовательности олигонуклеотидов можно найти в Таблице 2. Смешивали по 800 пмоль каждого олигонуклеотида в равном соотношении, осуществляли сборку при помощи 10 циклов ПЦР и амплификации в течение еще 10 циклов с использованием внешних праймеров. Указанные праймеры также внедряли в сайты рестрикции *XhoI* и

NheI для лигирования в фагмидный вектор pSE. Лигированную фагмиду экстрагировали из 2%-ного агарозного геля и очищали с применением набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen, Хильден, Германия). Продуктом трансформировали E. coli XL1 blue (Lucigen, Миддлтон, Висконсин, США) посредством электропорации с выходом  $5 \times 10^9$  членов.

*Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для конструирования библиотек ADAPT. Последовательности четырех олигонуклеотидов, использованных для сборки библиотек. NNN в fwdABDlib\_h1 и revABDlib\_h2\_v2 соответствуют кодонам, способным кодировать все аминокислоты, за исключением Pro, Cys и Gly с равным распределением. MNN в revABDlib\_h2 соответствует вырожденным кодонам NNK, но в обратном порядке*

| Олигонуклеотид  | Последовательность                                                                      |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| fwdABDlib_h1    | GATGAAGCCGTCGACGCCAATTCAGTGNNNNNNGCGAAANN<br>NNNNGCGNNNNNNNGAACTGNNNNNNNTATGGCGTGAGCGAT |
| revABDlib_h2    | TTCCACGGTTTTTCGCTTTMNNNAATCAGMNNMNNATAAAAAT<br>CGCTCACGCCATA                            |
| revABDlib_h3    | CGGCAGCGCCGCCAGAATATGCAGTTTCAGCGCTTCCACGCC<br>TTCCACGGTTTTTCGC                          |
| revABDlib_h2_v2 | TTCCACGGTTTTTCGCTTTNNNAATCAGNNNNNNNATAAAAATC<br>GCTCACGCCATA                            |

#### Получение и биотинилирование антигена-мишени

Все антигены-мишени, за исключением инсулина, получали в проекте Человеческий секретом (Стокгольм, Швеция), как описано ранее [19]. Рекомбинантный человеческий инсулин заказали в Thermo Scientific (Waltham, Массачусетс, США). Для биотинилирования антигенов-мишеней EZ-link сульфо-NHS-LC-биотин (Thermo Scientific, Waltham, Массачусетс, США) растворяли в воде до конечной концентрации 10 мМ и добавляли в 12-кратном молярном избытке к раствору антигена-мишени. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 30 мин. Непрореагировавший биотиновый реагент удаляли из образца при помощи обессоливающей колонки NAP5 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция).

#### Отбор при помощи фагового дисплея

Осуществляли четыре раунда пэннинга (два раунда для инсулиновой селекции) с применением биотинилированного рекомбинантного антигена-мишени (bTNF $\alpha$ , bCRP,

bPSA, bREN, bANG, bMYDGF, b-инсулин) в растворе с последующим захватом на покрытые стрептавидином магнитные шарики. Чтобы избавиться от неспецифически связывающихся фагов все пробирки и шарики, используемые в ходе отбора, промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором с 0,1% Tween-20 (PBS-T) и блокировали PBS-T с добавлением 0,5% желатина. Кроме того, всем раундам пэннинга предшествовала инкубация с 0,5 мг промытых и заблокированных покрытых стрептавидином магнитных шариков при комнатной температуре при 150 об./мин в течение 30 мин. Полученный супернатант затем использовали на входе в раундах пэннинга. В ходе пэннинга фаговые супернатанты инкубировали со 150, 100, 50 и 25 нМ антигена-мишени в раундах 1-4, соответственно. Инкубацию проводили в течение 2 часов при вращении перед захватом на покрытые стрептавидином магнитные шарики. Шарики промывали дважды PBS-T в раунде 1, четыре раза в раунде 2, восемь раз в раунде 3 и двенадцать раз в раунде 4. Связанные фаги элюировали 50 мМ глицином с pH 2,0 при комнатной температуре в течение 10 мин с последующей нейтрализацией равным объемом 10% 1M Tris-HCl в PBS с pH 8,0. Нейтрализованные элюаты затем использовали для инфицирования клеток *E. coli* XL1 blue по меньшей мере в 100х кратном избытке по сравнению с количеством элюированных фагов. После того, как инфицирование продолжалось в течение 30 минут, к клеткам добавляли равное количество триптического соевого бульона с дрожжевым экстрактом (TSB+YE) с добавлением 200 мкг/мл ампициллина и 10 мкг/мл тетрациклина. Через 30 минут добавляли хелперные фаги M13K07 в 10х кратном избытке по сравнению с числом клеток, использованных при инфицировании. Еще через 90 мин клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мл TSB+YE с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 0,1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) и наконец инкубировали в течение ночи при 30°C. Амплифицированные фаги собирали посредством осаждения полиэтиленгликолем (PEG) и использовали на входе в следующем раунде пэннинга.

### **Секвенирование нового поколения**

Фагмидную ДНК выделяли из *E. coli* XL1 blue, инфицированных элюатами фагов из разных раундов пэннинга или наивной библиотекой фагов, с использованием набора QIAprep Miniprep (Qiagen, Хильден, Германия). Осуществляли ПЦР с 50 нг очищенной фагмиды в качестве матрицы и 5 пмоль олигонуклеотида, содержащего прямую адаптерную последовательность, и 5 пмоль олигонуклеотида, содержащего

обратную адаптерную последовательность, а также специфическую для образца индекс-последовательность. Для уменьшения риска отклонений и ошибок ПЦР реакцию ограничивали 15 циклами. Искомый продукт ПЦР экстрагировали из 2%-ного агарозного геля и очищали с применением набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen, Хильден, Германия). Наконец, все образцы объединяли в пул в равных количествах с достижением общей концентрации 10 нМ. Секвенирование осуществляли в одной проточной ячейке на приборе Illumina MiSeq v2 и проводили в Национальной инфраструктуре геномики (Стокгольм, Швеция).

### **Анализ данных секвенирования**

Файлы FASTQ анализировали с применением программного обеспечения собственной разработки. Вначале отсортировывали корректные последовательности; последовательность считали корректной, если обнаруживали два сайта распознавания, девять оснований в направлении против хода транскрипции и девять оснований в направлении по ходу транскрипции от вариабельной области. Кроме того, расстояние между указанными двумя сайтами должно было иметь правильную длину, и все основания должны были иметь показатель качества Phred не менее 30. Затем для каждого секвенированного образца рассчитывали число всех встречающихся вариантов гена среди правильных последовательностей.

### **Субклонирование, получение и очистка ключевых ADAPT**

На основании результатов секвенирования нового поколения для дальнейшей оценки отбирали двенадцать различных обогащенных генных вариантов для каждого антигена. Отобранные гены встречались с высокой частотой только в треках для этого конкретного антигена и распределялись по нескольким разным кластерам последовательностей. Генные варианты для селекции в отношении TNF $\alpha$ , CRP, PSA, REN и инсулина синтезировали в Thermo Fisher Scientific (Waltham, Массачусетс, США) и амплифицировали с применением праймеров с фланкирующими областями, содержащими сайты рестрикции для субклонирования в индуцибельный экспрессирующий вектор T7. Варианты, отобранные при селекции к ANG и MYDGF, выделяли, как описано в следующем разделе. Последовательность конечных продуктов верифицировали с применением секвенирования по Сэнгеру в Microsynth Seqlab (Геттинген, Германия). Все варианты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21\*(DE3) и экстрагировали посредством обработки ультразвуком. Полученные лизаты подвергали очистке посредством аффинной хроматографии с применением смолы,

конъюгированной с человеческим сывороточным альбумином (HSA) (собственного приготовления).

### **Разработка стратегии ПЦР для спасения отдельных клонов**

Хотя первоначально были синтезированы гены пяти из семи отборов, как описано выше, также разработали более экономичную стратегию на основе стандартного протокола ПЦР и использовали для спасения клонов в селекции к ANG и MYDGF. В качестве прямых и обратных праймеров для амплификации уникальной последовательности и внедрения сайтов рестрикции для клонирования в экспрессирующий вектор использовали один уникальный олигонуклеотид, охватывающий рандомизированные положения в спирали 1, и другой, охватывающий рандомизированные положения в спирали 2, соответственно. Тот же самый индуцибельный экспрессирующий вектор T7, что и выше, снабжали третьей и нерандомизированной спиралью, в которую авторы данного изобретения также внедряли сайт рестрикции HindIII для сборки полноразмерной последовательности уникального варианта ADAPT.

### **Круговой дихроизм**

Вторичную структуру, температуры плавления и способность к повторному сворачиванию после денатурации оценивали при помощи спектрометра кругового дихроизма Chirascan (Applied Photophysics, Surrey, UK). Образцы разводили в PBS до концентрации 0,2 мг/мл и все анализы проводили в ячейке с длиной оптического пути 1 мм. Вторичную структуру оценивали путем измерения эллиптичности от 260 до 195 нм при 20°C. Температуры плавления определяли путем мониторинга сигнала при 221 нм при повышении температуры от 20°C до 100°C со скоростью 5°C в минуту. Способность к повторному сворачиванию оценивали путем повторной оценки вторичной структуры после тепловой обработки образца.

### **Оценка олигомерного состояния посредством эксклюзионной хроматографии**

Склонность вариантов ADAPT к агрегации оценивали посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Эксперименты осуществляли с применением системы ÄKTA Pure, снабженной колонкой Superdex 75 5/150 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция). Колонку уравнивали PBS и получали профили элюции путем инъекции 25 мкл очищенного белка (с концентрациями, варьирующими от 0,5 до 1 мг/мл) при скорости потока 0,45 мл/мин. Для сравнения использовали калибратор из

четырёх различных белков (кональбумин 75 кДа, карбангидраза 29 кДа, рибонуклеаза А 13,7 кДа и апротинин 7,5 кДа).

#### **Анализ связывания мишени**

Анализ связывания осуществляли с применением биосенсора Biacore T200 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция). Все анализы проводили с использованием сенсорных чипов CM-5, покрытых антигеном-мишенью, другим нерелевантным антигеном и HSA. Одну поверхность оставляли в качестве референсной. Анализ связывания осуществляли в PBS-T при 25°C. Варианты ADAPT разводили в PBS-T до 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ. Образцы инжестировали при скорости потока 30 мкл/мин в течение 120 с с последующим пропуском PBS-T в течение 240 с для отслеживания диссоциации. Регенерацию поверхности осуществляли при помощи 10 мМ HCl. Параметры кинетики определяли с применением программного обеспечения Biacore Insight Evaluation, предполагая связывание 1:1.

Одновременное связывание ADAPT с альбумином и антигеном-мишенью оценивали либо в анализе с предварительной инкубацией, либо в анализе с захватом. Анализ с предварительной инкубацией осуществляли путем инжестирования вариантов ADAPT, которые предварительно инкубировали с HSA в 10х кратном молярном избытке, на сенсорный чип с такими же параметрами, как при анализе связывания напрямую. Для анализа с захватом 500 нМ варианта ADAPT вначале захватывали на поверхности HSA в течение 50 секунд при скорости потока 10 мкл/мин с последующим инжестированием 200 или 500 нМ антигена-мишени. Антиген-мишень by;trnbhjdfkb при скорости потока 30 мкл/мин в течение 120 с последующим инжестированием PBS-T в течение 240 с для отслеживания диссоциации. Регенерацию поверхности осуществляли при помощи 10 мМ HCl.

#### **Оценка образования третичного комплекса посредством эксклюзионной хроматографии**

После демонстрации одновременного связывания с альбумином и антигеном-мишенью в SPR осуществляли стадию финальной характеристики для подтверждения образования третичного комплекса в растворе. HSA, ADAPT и антиген-мишень смешивали вместе в молярном соотношении 1:1:1 при общей концентрации 50 мкМ и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре перед инжестированием на колонку SEC. Отдельно инжестировали такие же количества каждого партнера по связыванию. Эксперименты осуществляли с применением системы ÄKTA Pure,

снабженной колонкой Superdex 75 5/150 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция). Колонку уравнивали PBS и регистрировали профили элюирования путем пропускания 25 мкл образца при скорости потока 0,45 мл/мин.

### ПРИМЕРЫ - РЕЗУЛЬТАТЫ

Для целей селекции функциональных однодоменных биспецифических связующих в отношении HSA, а также других антигенов-мишеней, разработали стандартный технологический процесс. После отбора при помощи фагового дисплея и анализа при помощи секвенирования следующей генерации выделяли одиночные клоны либо посредством синтеза, либо методом на основе ПЦР с уникальными олигонуклеотидами, охватывающими рандомизированные положения. Чтобы убедиться, что все итоговые кандидаты будут функциональными при дальнейшем применении, все варианты белков вначале оценивали по структуре и стабильности перед итоговым тестированием на связывание с различными антигенами-мишенями, а также с HSA. Те из них, которые были получены, очищены и прошли все проверки на качество в ходе технологического процесса, описаны ниже и объединены в Таблице 3.

*Таблица 3. Результаты характеристики вариантов ADAPT, связывающихся с мишенью, описывающие температуры плавления, способность к повторному сворачиванию, способность одновременно связываться с HSA и измеренные кинетические константы. Н.О. означает, что значение не поддается определению*

| Вариант<br>ADAPT | Tm [°C] | Повторное<br>сворачивание      |                                      | К <sub>D</sub> [M]<br>мишень | К <sub>D</sub> [M]<br>HSA |
|------------------|---------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                  |         | после<br>тепловой<br>обработки | Одновременное<br>связывание с<br>HSA |                              |                           |
| TNF $\alpha$ _05 | 50,00   | Да                             | Да                                   | $2,5 \times 10^{-9}$         | $1,8 \times 10^{-8}$      |
| TNF $\alpha$ _09 | 59      | Да                             | Да                                   | $3,6 \times 10^{-9}$         | $9,5 \times 10^{-9}$      |
| CRP_09           | 59      | Да                             | Нет                                  | $1,1 \times 10^{-6}$         | $7,7 \times 10^{-9}$      |
| CRP_23           | 68      | Да                             | Нет                                  | $1,9 \times 10^{-6}$         | $2,3 \times 10^{-8}$      |
| CRP_38           | 58      | Да                             | Нет                                  | $5,2 \times 10^{-8}$         | $1,3 \times 10^{-8}$      |
| CRP_48           | 67      | Да                             | Нет                                  | $6,2 \times 10^{-8}$         | $1,5 \times 10^{-8}$      |
| PSA_01           | 58      | Да                             | Да                                   | $2,8 \times 10^{-7}$         | $1,1 \times 10^{-9}$      |
| PSA_05           | 52      | Нет                            | Да                                   | $3,0 \times 10^{-7}$         | $3,3 \times 10^{-9}$      |

|            |      |     |     |                       |                      |
|------------|------|-----|-----|-----------------------|----------------------|
| REN_01     | 63   | Да  | Нет | $7,6 \times 10^{-8}$  | $2,3 \times 10^{-8}$ |
| REN_40     | 52   | Да  | Нет | $4,1 \times 10^{-7}$  | $5,5 \times 10^{-9}$ |
| ANG_2      | 46   | Да  | Да  | $5,4 \times 10^{-9}$  | $2,0 \times 10^{-9}$ |
| ANG_6      | 43   | Да  | Да  | $1,0 \times 10^{-11}$ | $1,1 \times 10^{-9}$ |
| ANG_13     | 38   | Да  | Да  | $2,8 \times 10^{-11}$ | $2,8 \times 10^{-9}$ |
| ANG_16     | 42   | Да  | Да  | $2,4 \times 10^{-9}$  | $1,0 \times 10^{-9}$ |
| MYDGF_07   | 61   | Да  | Да  | $2,3 \times 10^{-7}$  | $4,7 \times 10^{-9}$ |
| MYDGF_08   | 56   | Нет | Да  | $1,8 \times 10^{-7}$  | $1,2 \times 10^{-8}$ |
| Insulin_01 | Н.О. | Да  | Да  | $9,5 \times 10^{-7}$  | $3,9 \times 10^{-9}$ |
| Insulin_02 | 44   | Нет | Да  | $6,7 \times 10^{-7}$  | $1,5 \times 10^{-9}$ |
| Insulin_03 | 34   | Да  | Да  | $1,3 \times 10^{-6}$  | $3,1 \times 10^{-9}$ |

### Конструирование библиотеки фагового дисплея

Для обеспечения одновременного связывания как с нативным лигандом HSA, так и с другими клинически значимыми мишенями, сконструировали и создали новую комбинаторную библиотеку. Ранее для этой цели разработали ABD, благодаря чему получили библиотеку, показанную на Фиг. 1В, с рандомизированными положениями, распределенными по первой и третьей спиралям.

Первую библиотеку успешно использовали для разработки биспецифических связующих к нескольким мишеням. Однако, несмотря на то, что все они связывались со своими мишенями и отдельно с HSA, связывание HSA во всех случаях затрудняло одновременное связывание с антигеном-мишенью [13,15]. Авторы данного изобретения предположили, что достаточно крупная и объемная молекула HSA может создавать стерические препятствия вокруг связывающей поверхности спирали 1 и 3 и сочли, что сдвиг рандомизированной связывающей поверхности на спираль 1 и 2 может обеспечить новые возможности (Фиг. 1А). Поскольку авторы данного изобретения были озабочены тем, что мутирование положений в спирали 2 вблизи сайта связывания HSA могло бы повлиять на связывание, в основе библиотеки использовали ABD с созревшей аффинностью, известный как ABD035 [20].

Для конструирования новой библиотеки прямой олигонуклеотид, охватывающий спираль 1, включал вариации в положениях согласно Фиг. 1А и 1С с равномерным распределением всех природных аминокислот, за исключением Pro, Cys

и Gly, тогда как в основе обратного олигонуклеотида, охватывающего спираль 2, были вырожденные кодоны, внедряющие NNK в положения 22, 23 и 26. Итоговый обратный олигонуклеотид, охватывающий третью спираль, содержал только константные положения.

Рандомизированные положения в спирали 1 и 2 выбирали на основе положения их боковых цепей, которые, согласно предположениям, были расположены на достаточном расстоянии от связывающей HSA поверхности, как показано на кристаллической структуре, описанной Lejon et al [21]. Кроме того, дизайн библиотеки также основывался на ранее полученных сведениях об остатках, которые не задействованы напрямую в связывании HSA, а также о положениях, которые ранее с успехом замещали [22]. Остатков, которые при выравнивании последовательностей оказались высоко консервативными в гомологичных доменах, и, следовательно, считались важными, избегали. После сборки полного гена, кодирующего варианты ADAPT в количестве, соответствующем  $10^{14}$  индивидуумов, библиотекой трансформировали клетки XL1 blue с получением в результате  $5 \times 10^9$  вариантов. Итоговую наивную библиотеку секвенировали при помощи Illumina MiSeq, получив более 500 000 прочтений, и продемонстрировали вариацию и распределение аминокислот, соответствующие параметрам дизайна (данные не приведены).

### **Отбор посредством фагового дисплея и оценка последовательности**

Провели четыре раунда пэннинга против четырех из пяти биотинилированных антигенов-мишеней: bTNF $\alpha$  (19,5 кДа), bCRP (25,7 кДа), bPSA (29,5 кДа) и bREN (44,9 кДа). При отборе к инсулину (5,8 кДа) секвенирование осуществляли уже после двух раундов пэннинга. Секвенирование следующей генерации с баркодированными адаптерными последовательностями позволило оценить обогащение последовательностями в ходе отборов. Первые четыре раунда отбора продемонстрировали обогащение определенными последовательностями, а также устойчивую консенсусную последовательность после четвертого раунда пэннинга, и обогащение обнаруживалось также после второго раунда пэннинга при отборе к инсулину, хотя, как и ожидалось, не столь отчетливо (данные не приведены). Отбор в отношении TNF $\alpha$  (данные не приведены) служит в качестве примера, где изучали распределение аминокислот в 100 наиболее обогащенных последовательностях в различных раундах пэннинга. В данном примере можно заметить, что равномерное распределение аминокислот в наивной библиотеке изменяется в сторону некоторых

предпочтительных аминокислот в ходе пэннинга. В этом же примере можно также видеть, что аминокислота пролин достаточно часто встречается в положении 23 и 26 спирали 2. Пролин, известный своей жесткой структурой и свойством нарушать спираль, наряду с подвижным глицином и образующим дисульфид цистеином, исключали при дизайне из спирали 1. Авторы данного изобретения предположили, что эти аминокислоты не будут представлять большую проблему в спирали 2, но сравнив результаты разных отборов, увидели неожиданное обогащение одной или более из указанных трех аминокислот при всех отборах. На основании этих результатов сконструировали новую библиотеку, с равномерным распределением 17 оставшихся аминокислот в спирали 1 и в спирали 2. Для оценки новой версии библиотеки провели два дополнительных отбора с использованием антигенов-мишеней ангиогенина (ANG) (16,8 кДа) и миелоидного фактора роста (MYDGF) (18,9 кДа). Такие отборы привели к обогащению соответствующими последовательностями, не содержащими Cys, Pro или Gly, как и ожидалось, исходя из дизайна библиотеки.

При сравнении обогащения аминокислотами в каждом положении при различных отборах (данные не приведены) создается впечатление, что расположение связывающей поверхности несколько различается для различных антигенов-мишеней. Это не очень удивительно, поскольку антигены-мишени различаются своими молекулярными свойствами, и можно предположить, что различные положения аминокислот могут быть по-разному доступны для различных антигенов-мишеней.

Другой интересной находкой, полученной по результатам секвенирования, было то, что во всех отборах, независимо от мишени, обнаруживалось сильное предпочтение к гидрофобным аминокислотам в положении 6 (A, I, L, V и W), и большая часть последовательностей, отобранных в отношении TNF $\alpha$ , PSA, CRP и ANG, даже содержала валин, присутствующий в родительском ABD035. Эти результаты позволяют предположить, что возможно улучшить и переработать конструкцию библиотеки, чтобы сделать ее еще более сфокусированной.

На основе данных секвенирования выбрали некоторые перспективные варианты ADAPT для дальнейшей характеристики. Синтезировали двенадцать вариантов из каждого отбора в отношении TNF $\alpha$ , CRP, PSA, REN, ANG и MYDGF и клонировали в экспрессирующие векторы для получения и очистки. Варианты выбирали на основе их относительной частоты, а также их распределения среди нескольких последовательных кластеров. В случае отбора к инсулину использовали альтернативную стратегию, где

варианты отбирали уже после двух раундов пэннинга, исходя из того факта, что предыдущие примеры (данные не приведены) показали, что обогащение было достаточным уже на такой ранней стадии. В Таблице 4 показаны клоны с наибольшим рейтингом по результатам MiSeq, полученные во втором раунде пэннинга при отборе к инсулину. Четыре из этих вариантов демонстрировали высокое сходство последовательностей и поэтому были отобраны для дальнейшей характеристики.

*Таблица 4. Клоны с наибольшим рейтингом после двух раундов отбора в отношении инсулина. Клоны, отобранные для дальнейшей характеристики, выделены жирным шрифтом*

| Ранжирование | Последовательность<br>(вариабельные положения) | #<br>последовательностей | % от общего  |
|--------------|------------------------------------------------|--------------------------|--------------|
| <b>1</b>     | <b>VI..AY..QY..AF..SD..K</b>                   | <b>148</b>               | <b>0,114</b> |
| <b>2</b>     | <b>AI..AY..QY..SF..RE..V</b>                   | <b>91</b>                | <b>0,070</b> |
| 3            | NA..WV..LN..YD..SR..I                          | 88                       | 0,068        |
| <b>4</b>     | <b>AV..AY..KY..AF..NE..L</b>                   | <b>70</b>                | <b>0,054</b> |
| 5            | IW..AS..VR..HR..YE..V                          | 55                       | 0,042        |
| 6            | EQ..WA..MW..ST..IL..T                          | 32                       | 0,025        |
| 7            | YR..LW..WV..KK..MA..F                          | 26                       | 0,020        |
| 8            | FL..WA..NY..AR..LY..A                          | 24                       | 0,018        |
| 9            | IW..VL..HS..WQ..YP..F                          | 22                       | 0,017        |
| <b>10</b>    | <b>QV..AY..KY..AF..MS..Q</b>                   | <b>22</b>                | <b>0,017</b> |
| 11           | NA..WH..VN..YY..AR..L                          | 12                       | 0,009        |
| 12           | LW..SV..RM..AD..LC..K                          | 10                       | 0,008        |

Некоторые из других клонов с наибольшим рейтингом также обнаруживались в других отборах к другим мишеням и поэтому были отброшены. Это вероятно является результатом ошибок секвенирования, неспецифического обогащения или контаминации в ходе отбора. Независимо от причины, сравнение результатов нескольких отборов к различным мишеням оказалось эффективной стратегией для исключения не специфических в отношении мишени последовательностей.

#### **Характеризация структуры и стабильности ведущих вариантов ADAPT**

У всех вариантов ADAPT, полученных с достаточным выходом, оценивали их термостабильность и вторичную структуру при помощи кругового дихроизма.

Кандидатов, демонстрировавших ожидаемое содержание альфа-спиралей с двумя характерными бороздами приблизительно 222 нм и 208 нм (Фиг. 3) отбирали для дальнейшей характеристики. Термостабильность вариантов варьировала в зависимости от температур плавления ( $T_m$ ) в диапазоне от 34°C до 67°C (Таблица 3), что означало, что некоторые отобранные варианты обладали повышенной стабильностью, тогда как другие имели пониженную стабильность по сравнению с родительской молекулой ABD035 с известной  $T_m$  58°C [20]. Несколько вариантов также обладали способностью к повторному сворачиванию после тепловой денатурации (Таблица 3, Фиг. 3). У тех вариантов, которые продемонстрировали высокое содержание альфа-спиралей, дополнительно оценивали их склонность образовывать нежелательные олигомеры. Для этого проводили анализ с применением колонок для эксклюзионной хроматографии. Образцы с одиночными пиками (с надлежащим временем элюирования относительно стандарта) считали находящимися в мономерном состоянии (Фиг. 4). Варианты с пиками, соответствующими более крупным комплексам или продуктам деградации, исключали из дальнейшей характеристики.

#### **Оценка связывания мишени, аффинности и одновременного связывания с HSA**

У вариантов с достаточной альфа-спиральной структурой, а также профилями элюирования мономеров из колонки SEC далее анализировали связывание с их белком-мишенью, а также с HSA. Связывание с антигеном-мишенью, использовавшимся при отборе, измеряли посредством мультициклического анализа с использованием SPR, продемонстрировав, что несколько связующих обладали аффинностью в микромолярном-пикомолярном диапазоне. Варианты ADAPT считали связующими, только если они демонстрировали связывание исключительно с молекулой-мишенью, но не с другими нерелевантными белками-мишенями. Анализ выявил 19 вариантов ADAPT, которые связывали свой белок-мишень специфическим образом (варианты и их характеристики обобщены в Таблице 3). После установления связывания у вариантов также оценивали их способность одновременно связывать HSA. Это осуществляли либо при помощи анализа захвата методом SPR, либо в эксперименте, где ADAPT предварительно инкубировали в условиях с насыщением HSA перед анализом связывания с мишенью. На Фиг. 2А приведен репрезентативный пример связывания ADAPTInsulin\_02 с инсулином и с HSA при инъектировании в чистом виде. Кроме того, на этой фигуре также показано, что ADAPTInsulin\_02 по-прежнему

способен связываться с инсулином после инкубирования с HSA в насыщающих концентрациях, что дополнительно подтверждалось тем фактом, что он уже был не способен связываться с HSA (Фиг. 2B). В целом, тринадцать из охарактеризованных связующих, отобранных с использованием TNF $\alpha$ , PSA, ANG, MYDGF и инсулина, могли одновременно связываться как с HSA, так и со своим антигеном-мишенью. На Фиг. 5 приведены сенсограммы для этих тринадцати вариантов в исследовании с захватом.

### **Оценка образования третичного комплекса посредством эксклюзионной хроматографии**

В качестве финальной характеристики оценивали способность образовывать в растворе третичный комплекс, состоящий из вариантов ADAPT с альбумином, а также с антигеном-мишенью. ADAPTInsulin\_02 вместе с его мишенями служит в качестве примера на Фиг. 6. На данной хроматограмме можно заметить небольшой сдвиг в профиле элюирования, когда допускали образование третичного комплекса, в сравнении с инъектированием бинарного комплекса, а также отдельных партнеров по связыванию. Наложение сигналов обусловлено ограниченным разрешением колонки SEC. Дополнительным подтверждением образования комплекса служит то, что при пропуске комплекса свободный ADAPTInsulin\_02 не определялся, и определялось лишь незначительное количество свободного инсулина. Эти данные подтверждают замеченное авторами данного изобретения по результатам SPR, что ADAPT не только являются биспецифическими, но также могут одновременно связываться с альбумином и со своей мишенью.

### **Обсуждение**

Таким образом, авторы данного изобретения создали новую комбинаторную библиотеку с целью разработки биспецифических ADAPT к различным новым мишеням в дополнение к сывороточному альбумину. Применяв стратегию фагового дисплея и секвенирования нового поколения, они обнаружили и оценили биспецифические связующие к семи различным мишеням и для пяти из них продемонстрировали одновременное связывание с альбумином. Эти однодоменные биспецифические связующие дают возможность объединять преимущества небольших молекул, такие как хорошее проникновение в ткани и неинвазивные пути введения, с преимуществами гораздо более крупных молекул, имеющих существенно больший период полувыведения *in vivo*.

Результаты данного исследования подтверждают, что небольшой 6 кДа домен действительно может вмещать две отдельные связывающие поверхности и, следовательно, может связывать альбумин без негативного влияния на свой размер или на связывание с нужной мишенью. Кроме того, авторы данного изобретения также разработали эффективный технологический процесс, объединяющий фаговый дисплей с секвенированием нового поколения, позволяющий осуществлять оперативный и экономичный отбор таких связующих для гораздо большего числа мишеней в будущем.

Связующие, или биспецифические белки, были обнаружены посредством фагового дисплея в комбинации с высокопроизводительным секвенированием Illumina для лучшего понимания процесса обогащения. Технология фагового дисплея позволила осуществить невероятные открытия и привела к смене парадигмы в области разработки антител, однако и она не лишена недостатков. Осуществление повторных раундов пэннинга, после каждого из которых следует стадия амплификации в бактериальных клетках, неизбежно вносит системную ошибку. Кроме того, сильное обогащение одной или несколькими последовательностями приводит к потере разнообразия последовательностей и, следовательно, потере некоторых релевантных вариантов, которые просто размножаются не так быстро по сравнению с другими. Поэтому секвенирование нового поколения особенно подходит для применения к экспонированным на фаге ADAPT, поскольку одно прочтение 150 пн посредством Illumina MiSeq охватывает всю длину рандомизированной последовательности. Также, путем объединения в пул множества образцов с индивидуальными баркодами в одном анализе, авторы данного изобретения получили сотни тысяч последовательностей из всех различных отборов и раундов пэннинга с небольшими затратами. Другим преимуществом секвенирования нового поколения несомненно является глубина данных. Глядя на частоту, с которой появляются отобранные связующие в соответствующих фаговых пулах (Таблица 5), можно отметить, что не все последовательности могут быть обнаружены с высокой вероятностью при использовании традиционных способов секвенирования по Сэнгеру (Sanger). Кроме того, путем секвенирования более ранних раундов пэннинга авторы данного изобретения смогли обнаружить, что связывающие варианты были обогащены в достаточной степени для того, чтобы быть обнаруженными уже после раунда 2 (данные не приведены). Для проверки этого на практике, авторы данного изобретения провели отбор с использованием инсулина и выбрали четыре секвенированных клона, которые

появлялись уже после двух раундов пэннинга, из которых три демонстрировали одновременное связывание. Это подтверждает ранее опубликованные данные, что положительные клоны обнаруживались без необходимости в кропотливых повторных раундах пэннинга [24,25]. В частности, данная стратегия была бы невозможной без секвенирования нового поколения, поскольку варианты, связывающиеся с инсулином, присутствовали в количестве, составлявшем всего лишь 0,1% от общего пула фагов.

Несмотря на преимущества секвенирования нового поколения, основным ограничением данного технологического процесса является выделение отдельных клонов из пула фагов после обнаружения. В ходе работы над данным проектом авторы данного изобретения в основном работали с синтезированными генными фрагментами, что является не очень экономичной альтернативой при необходимости скрининга множества вариантов. Позднее для преодоления этого недостатка авторы данного изобретения также разработали стратегию на основе ПЦР, где для спасения отдельных клонов применялись уникальные, но более короткие олигонуклеотиды. Тот факт, что положительные клоны могут быть обнаружены уже после двух раундов пэннинга, а также выделены простым способом на основе ПЦР, позволяет существенно экономить время и снижать материальные затраты в процессе фагового дисплея. Это также устраняет некоторые препятствия, связанные с осуществлением многих параллельных отборов мультиплексным и высокопроизводительным образом.

После характеристики обогащенных вариантов можно было отметить, что несколько биспецифических связующих были обнаружены во всех семи отборах. Измеренные значения аффинности находились в пиколярном - микролярном диапазонах, при этом единственным исключением был ангиотензин, это является результатом относительно быстрого связывания, а также быстрой диссоциации (Таблица 5). Чтобы оставшиеся молекулы имели большую терапевтическую ценность, потребуется аффинное созревание, чтобы улучшить скорость диссоциации, что наиболее важно. Авторы данного изобретения полагают, что более жесткие условия отбора могут быть одним из способов улучшения скоростей диссоциации и, следовательно, повышения аффинностей. Авторы данного изобретения также считают, что понимание предпочтения аминокислот в каждом положении поможет в конструировании новых и еще более сфокусированных библиотек с созревшей аффинностью. Кроме того, поскольку основанием для выбора этих вариантов ADAPT было их появление в различных кластерах последовательностей, другой стратегией

может быть более глубокий поиск среди кластеров, в которых были обнаружены связывающиеся варианты.

Любопытно, что даже несмотря на то, что биспецифические связующие были обнаружены во всех отборах, независимо от использованного антигена-мишени, не все из них позволяли получить связующие, которые бы одновременно связывались с обеими своими мишенями. Одновременное связывание было обнаружено для TNF $\alpha$ , PSA, ANG, MYDGF и инсулина, но не для CRP и REN. Учитывая размеры этих мишеней, неясно, могла ли молекулярная масса влиять на способность к одновременному связыванию, даже если кажется вероятным, что в случае более крупных антигенов-мишеней риск возникновения стерических препятствий более вероятен. Однако, создается впечатление, что сохраненные области последовательности у одновременно связывающихся больше сдвинуты к спирали 1, тогда как у связывающихся не одновременно больше консенсусных последовательностей также в спирали 2. Поскольку поверхность связывания HSA в основном расположена вокруг спирали 2, это может объяснять, почему одни связываются одновременно, а другие нет. Авторы данного изобретения уверены, что по мере накопления знаний, полученных в ходе этого и будущих отборов, станет возможным создать более сфокусированную библиотеку, которая позволит добиться еще большего успеха в отборе множества связующих, которые будут не только биспецифическими, но и связывающимися одновременно.

Как и ожидалось авторами изобретения, все варианты связывали HSA слабее по сравнению с родительским ABD035. Однако, аффинности все еще находились в низком наномолярном диапазоне, и с учетом очень высокой концентрации HSA в сыворотке все эти аффинности были намного выше тех, что необходимы для эффективного увеличения времени полужизни. Действительно, предыдущие исследования показали, что аффинность лишь незначительно сказывается на увеличении времени полужизни, даже если аффинности находятся в микромолярном диапазоне [26].

Таблица 5. Дополнительные данные для связывания вариантов ADAPT с мишенями. Частота в данных секвенирования получена для раунда 4 в случае *TNF $\alpha$* , *CRP*, *PSA*, *REN*, *ANG*, *MYDGF* и для раунда 2 в случае инсулина

| Вариант ADAPT    | Частота в      | $K_D$ [M] | $k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ] | $k_d$ [ $s^{-1}$ ] | $K_D$ [M]            | $k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ] | $k_d$ [ $s^{-1}$ ] |
|------------------|----------------|-----------|--------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
|                  | данных         | Мишень    | Мишень                   | Мишень             | HSA                  | HSA                      | HSA                |
|                  | секвенирования |           |                          |                    |                      |                          |                    |
|                  | [%]            |           |                          |                    |                      |                          |                    |
| TNF $\alpha$ _05 | 2,99           | 2,5e-09   | 1,5e+06                  | 3,7e-03            | $1,8 \times 10^{-8}$ | 2,1e+04                  | 3,9e-04            |
| TNF $\alpha$ _09 | 43,4           | 3,6e-09   | 8,9e+05                  | 3,2e-03            | 9,5e-08              | 3,6e+04                  | 3,4e-04            |
| CRP_09           | 0,048          | 1,1e-06   | 1,2e+03                  | 1,3e-03            | 7,7e-09              | 4,9e+05                  | 3,8e-03            |
| CRP_23           | 0,027          | 1,9e-06   | 8,9e+02                  | 1,7e-03            | 2,3e-08              | 3,0e+05                  | 7,0e-03            |
| CRP_38           | 1,884          | 5,2e-08   | 3,3e+04                  | 1,7e-03            | 1,3e-08              | 4,1e+05                  | 5,4e-03            |
| CRP_48           | 0,35           | 6,2e-08   | 1,9e+04                  | 1,2e-03            | 1,5e-08              | 2,8e+05                  | 4,2e-03            |
| PSA_01           | 44,9           | 2,8e-07   | 3,6e+05                  | 1,0e-01            | 1,1e-09              | 1,1e+06                  | 1,2e-03            |
| PSA_05           | 6,67           | 3,0e-07   | 2,0e+05                  | 5,9e-02            | 3,3e-09              | 9,2e+04                  | 3,0e-04            |
| REN_01           | 62,8           | 7,6e-08   | 3,2e+04                  | 2,4e-03            | 2,3e-08              | 1,2e+04                  | 2,7e-04            |
| REN_40           | 0,016          | 4,1e-07   | 8,7e+03                  | 3,5e-03            | 5,5e-09              | 1,2e+05                  | 6,4e-04            |
| ANG_02           | 0,495          | 1,4e-08   | 5,2e+04                  | 7,0e-04            | 2,0e-09              | 2,3e+04                  | 4,5e-05            |
| ANG_06           | 5,304          | 4,9e-09   | 6,5e+04                  | 3,2e-04            | 1,1e-09              | 2,4e+04                  | 2,6e-05            |
| ANG_13           | 0,610          | 2,8e-11   | 1,1e+05                  | 2,9e-06            | 2,8e-09              | 2,5e+04                  | 6,8e-05            |

|            |       |          |         |         |         |         |         |
|------------|-------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ANG_16     | 0,329 | 5,1e-09  | 9,9e+04 | 5,0e-04 | 1,0e-09 | 2,9e+04 | 3,0e-05 |
| MYDGF_07   | 0,192 | 2,3e-07  | 3,5e+05 | 8,2e-02 | 4,7e-09 | 3,0e+04 | 1,4e-04 |
| MYDGF_08   | 2,172 | 1,8e-07  | 1,0e+06 | 1,8e-01 | 1,2e-08 | 2,3e+04 | 2,8e-04 |
| Insulin_01 | 0,070 | 9,5e-07  | 2,4e+05 | 2,2e-01 | 3,9e-09 | 3,6e+05 | 1,4e-03 |
| Insulin_02 | 0,017 | 6,7e-07  | 1,8e+05 | 1,2e-01 | 1,5e-09 | 6,4e+05 | 9,3e-04 |
| Insulin_03 | 0,054 | 1,3 e-06 | 1,8e+05 | 2,2e-01 | 3,1e-09 | 4,6e+05 | 1,4e-03 |

## Литература

- [1] L. Urquhart, Top drugs and companies by sales in 2017, *Nature*. 17 (2018) 232.
- [2] A.L. Grilo, A. Mantalaris, The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 9–16. doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
- [3] R. Bajracharya, J.G. Song, S.Y. Back, H.-K. Han, Recent Advancements in Non-Invasive Formulations for Protein Drug Delivery, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* (2019). doi:10.1016/j.csbj.2019.09.004.
- [4] M.D. Donovan, Y. Huang, Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption, 1998.
- [5] A. Orlova, H. Wällberg, S. Stone-Elander, V. Tolmachev, On the selection of a tracer for PET imaging of HER2-expressing tumors: Direct comparison of <sup>124</sup>I-labeled affibody molecule and trastuzumab in a murine xenograft model, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 417–425. doi:10.2967/jnumed.108.057919.
- [6] R. Goldstein, J. Sosabowski, M. Livanos, J. Leyton, K. Vigor, G. Bhavsar, G. Nagy-Davidescu, M. Rashid, E. Miranda, J. Yeung, B. Tolner, A. Plückthun, S. Mather, T. Meyer, K. Chester, Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 42 (2015) 288–301. doi:10.1007/s00259-014-2940-2.
- [7] J. Garousi, S. Lindbo, J. Nilvebrant, M. Åstrand, J. Buijs, M. Sandström, H. Honarvar, A. Orlova, V. Tolmachev, S. Hober, ADAPT, a Novel Scaffold Protein-Based Probe for Radionuclide Imaging of Molecular Targets That Are Expressed in Disseminated Cancers, *Cancer Res.* 75 (2015) 4364–4371. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3497.
- [8] R.E. Kontermann, Strategies to Extend Plasma Half-Lives of Recombinant Antibodies, n.d.
- [9] V. Tolmachev, A. Orlova, R. Pehrson, J. Galli, B. Bastrup, K. Andersson, M. Sandström, D. Rosik, J. Carlsson, H. Lundqvist, A. Wennborg, F.Y. Nilsson, Radionuclide Therapy of HER2-Positive Microxenografts Using a Lu-Labeled HER2-Specific Affibody Molecule, *Cancer Res.* 67 (2007) 2773–2782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1630.
- [10] A. Orlova, A. Jonsson, D. Rosik, H. Lundqvist, M. Lindborg, L. Abrahmsen, C. Ekblad, F.Y. Frejd, V. Tolmachev, Site-specific radiometal labeling and improved biodistribution using ABY-027, a novel HER2-targeting affibody molecule-albumin-binding domain fusion protein, *J. Nucl. Med.* 54 (2013) 961–968. doi:10.2967/jnumed.112.110700.

- [11] H. Liu, S. Lindbo, H. Ding, M. Altai, J. Garousi, A. Orlova, V. Tolmachev, S. Hober, T. Gräslund, Potent and specific fusion toxins consisting of a HER2-binding, ABD-derived affinity protein, fused to truncated versions of *Pseudomonas* exotoxin A, *Int. J. Oncol.* 55 (2019) 309–319. doi:10.3892/ijo.
- [12] K.M.K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H.T. Noordzij, I. Sandlie, J.T. Andersen, Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics, *Front. Immunol.* 5 (2015) 682. doi:10.3389/fimmu.2014.00682.
- [13] T. Alm, L. Yderland, J. Nilvebrant, A. Halldin, S. Hober, A small bispecific protein selected for orthogonal affinity purification, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 605–617. doi:10.1002/biot.201000041.
- [14] J. Nilvebrant, T. Alm, S. Hober, J. Löfblom, Engineering Bispecificity into a Single Albumin-Binding Domain, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0025791.
- [15] J. Nilvebrant, M. Åstrand, M. Georgieva-Kotseva, M. Björnmalm, J. Löfblom, S. Hober, Engineering of Bispecific Affinity Proteins with High Affinity for ERBB2 and Adaptable Binding to Albumin, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0103094.
- [16] J. Nilvebrant, M. Åstrand, J. Löfblom, S. Hober, Development and characterization of small bispecific albumin-binding domains with high affinity for ErbB3, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 3973–3985. doi:10.1007/s00018-013-1370-9.
- [17] A. Zorzi, S. Linciano, A. Angelini, Non-covalent albumin-binding ligands for extending the circulating half-life of small biotherapeutics, *Med. Chem. Commun.* 10 (2019) 1068. doi:10.1039/c9md00018f.
- [18] C. Grönwall, A. Jonsson, S. Lindström, E. Gunneriusson, S. Ståhl, N. Herne, Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid  $\beta$  peptides, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 162–183. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.09.013.
- [19] M. Uhlen, H. Tegel, Å. Sivertsson, C.-C. Kuo, J.M. Gutierrez, N.E. Lewis, B. Forsström, M. Dannemeyer, L. Fagerberg, M. Malm, H. Vunk, F. Edfors, A. Hober, E. Sjöstedt, D. Kotol, J. Mulder, A. Mardinoglu, J.M. Schwenk, P. Nilsson, M. Zwahlen, J. Ottosson Takanen, K. Von Feilitzen, C. Stadler, C. Lindskog, F. Ponten, J. Nielsen, B.O. Palsson, A.-Luisavolk, M. Lundqvist, A. Berling, A.-S. Svensson, S. Kanje, H. Enstedt, D. Afshari, S. Ekblad, J. Scheffel, B. Katona, J. Vuu, E. Lindström, L. Xu, R. Mihai, L. Bremer, M. Westin, M. Muse, L.M. Mayr, S. Knight, S. Göpel, R. Davies, P. Varley, D. Hatton, R. Fields, B.G. Voldborg, J. Rockberg, L.H. Schiavone, S. Hober, The human secretome – the

proteins secreted from human cells, *BioRxiv*. (2018) 465815. doi:10.1101/465815.

[20] A. Jonsson, J. Dogan, N. Herne, L. Abrahmsén, P.Å. Nygren, Engineering of a femtomolar affinity binding protein to human serum albumin, *Protein Eng. Des. Sel.* 21 (2008) 515–527. doi:10.1093/protein/gzn028.

[21] S. Lejon, I.-M. Frick, L. Björck, S. Svensson, Crystal Structure and Biological Implications of a Bacterial Albumin Binding Module in Complex with Human Serum Albumin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42924–42928. doi:10.1074/jbc.M406957200.

[22] M.U. Johansson, I.-M. Frick, H. Nilsson, P.J. Kraulis, S. Hober, P. Jonasson, M. Linhult, P.-Å. Nygren, M. Uhlé, L. Björck, T. Drakenberg, S. Forsé, M. Wikström, Structure, Specificity, and Mode of Interaction for Bacterial Albumin-binding Modules\*, (2001). doi:10.1074/jbc.M109943200.

[23] J.T. Andersen, R. Pehrson, V. Tolmachev, M.B. Daba, L. Abrahmsén, C. Ekblad, Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 5234–5241. doi:10.1074/jbc.M110.164848.

[24] A. Christiansen, J. V. Kringelum, C.S. Hansen, K.L. Bøgh, E. Sullivan, J. Patel, N.M. Rigby, T. Eiwegger, Z. Szépfalusi, F. De Masi, M. Nielsen, O. Lund, M. Dufva, High-throughput sequencing enhanced phage display enables the identification of patient-specific epitope motifs in serum, *Nat. Publ. Gr.* (2015). doi:10.1038/srep12913.

[25] P.A.C. 't Hoen, S.M.G. Jirka, B.R. ten Broeke, E.A. Schultes, B. Aguilera, K.H. Pang, H. Heemskerk, A. Aartsma-Rus, G.J. van Ommen, J.T. den Dunnen, Phage display screening without repetitious selection rounds, *Anal. Biochem.* 421 (2012) 622–631. doi:10.1016/J.AB.2011.11.005.

[26] J. Hopp, N. Hornig, K.A. Zettlitz, A. Schwarz, N. Fuß, D. Mü, R.E. Kontermann, The effects of affinity and valency of an albumin-binding domain (ABD) on the half-life of a single-chain diabody-ABD fusion protein, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (2010) 827–834. doi:10.1093/protein/gzq058.

[27] J. Garousi, S. Lindbo, J. Borin, E. von Witting, A. Vorobyeva, M. Oroujeni, B. Mitran, A. Orlova, J. Buijs, V. Tolmachev, S. Hober, Comparative evaluation of dimeric and monomeric forms of ADAPT scaffold protein for targeting of HER2-expressing tumours, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 134 (2019) 37–48. doi:10.1016/j.ejpb.2018.11.004.

[28] V. Tolmachev, M. Friedman, M. Sandström, T.L.J. Eriksson, D. Rosik, M. Hodik,

S. Ståhl, F.Y. Frejd, A. Orlova, Affibody molecules for epidermal growth factor receptor targeting in vivo: Aspects of dimerization and labeling chemistry, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 274–283. doi:10.2967/jnumed.108.055525.

[29] Z. Li, B.F. Krippendorff, S. Sharma, A.C. Walz, T. Lavé, D.K. Shah, Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments, *MAbs.* 8 (2016) 113–119. doi:10.1080/19420862.2015.1111497.

[30] H. Maeda, Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects, (2010). doi:10.1021/bc100070g.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифический белок, способный связывать человеческий сывороточный альбумин (HSA) и другую мишень, который содержит аминокислотную последовательность LAEAKVLANR X<sub>11</sub>LDKX<sub>15</sub>GX<sub>17</sub>SX<sub>19</sub>X<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LI X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>AKT VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>X<sub>36</sub>LX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID No. 1), где:

X<sub>11</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>19</sub>, X<sub>27</sub>, X<sub>33</sub>, X<sub>35</sub>, X<sub>36</sub>, X<sub>38</sub> и X<sub>39</sub> независимо друг от друга представляют собой любую аминокислоту;

X<sub>43</sub>, X<sub>44</sub>, X<sub>45</sub> и X<sub>46</sub> независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой любую аминокислоту;

X<sub>20</sub> представляет собой Y или F;

X<sub>23</sub> представляет собой N, D или R;

X<sub>26</sub> представляет собой N или D; и

X<sub>40</sub> представляет собой E или H,

при условии, что по меньшей мере одно из положений 22, 23 и 26 и по меньшей мере одно из положений 2, 3, 6, 7, 9, 10, 13 и 14 мутированы относительно SEQ ID No. 1 для достижения аффинности к указанной другой мишени.

2. Биспецифический белок по п. 1, где по меньшей мере два из положений 22, 23 и 26 мутированы относительно SEQ ID No. 1 для достижения аффинности к указанной другой мишени.

3. Биспецифический белок по п. 1 или п. 2, где все положения 22, 23 и 26 мутированы относительно SEQ ID No. 1 для достижения аффинности к указанной другой мишени.

4. Биспецифический белок по любому из пп. 1-3, где по меньшей мере одно из положений 2, 9 и 13 мутировано относительно SEQ ID No. 1 для достижения аффинности к указанной другой мишени.

5. Биспецифический белок по любому из пп. 1-4, где положение 9 мутировано относительно SEQ ID No. 1 для достижения аффинности к указанной другой мишени.

6. Биспецифический белок по любому из пп. 1-5, где:

X<sub>27</sub> представляет собой N, K или D; и/или

X<sub>33</sub> представляет собой G, E, S или D.

7. Биспецифический белок по любому из пп. 1-6, где X<sub>36</sub> представляет собой D, A, S, E или K.

8. Биспецифический белок по любому из пп. 1-7, где ни одна из аминокислот в

положениях 1-15 не представляет собой С.

**9.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-8, где ни одна из аминокислот в положениях 19-26 не представляет собой С.

**10.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-9, где ни одна из аминокислот в положениях 31-44 не представляет собой С.

**11.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-10, где ни одна из аминокислот в положениях 1-15 не представляет собой G.

**12.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-11, где ни одна из аминокислот в положениях 19-26 не представляет собой G.

**13.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-12, где ни одна из аминокислот в положениях 1-15 не представляет собой Р.

**14.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-13, где ни одна из аминокислот в положениях 19-26 не представляет собой Р.

**15.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-14, где ни одна из аминокислот в положениях 31-44 не представляет собой Р.

**16.** Биспецифический белок по любому из пп. 1-15, где каждое из положений 1, 4, 5, 8, 12, 16, 25, 31, 34 и 42 независимо является консервативным или консервативно замещенным.

**17.** Полинуклеотид, кодирующий биспецифический белок по любому из пп. 1-16.

**18.** Экспрессирующая кассета, содержащая полинуклеотид по п. 17.

**19.** Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 16 или экспрессирующую кассету по п. 17.

**20.** Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический белок по любому из пп. 1 - 16.

**21.** Фармацевтическая композиция по п. 20, где молекула-мишень выбрана из группы, содержащей фактор некроза опухолей альфа (TNF $\alpha$ ), простатспецифический антиген (PSA), С-реактивный белок (CRP), ренин (REN), ангиогенин (ANG), миелоидный фактор роста (MYDGF) и инсулин.

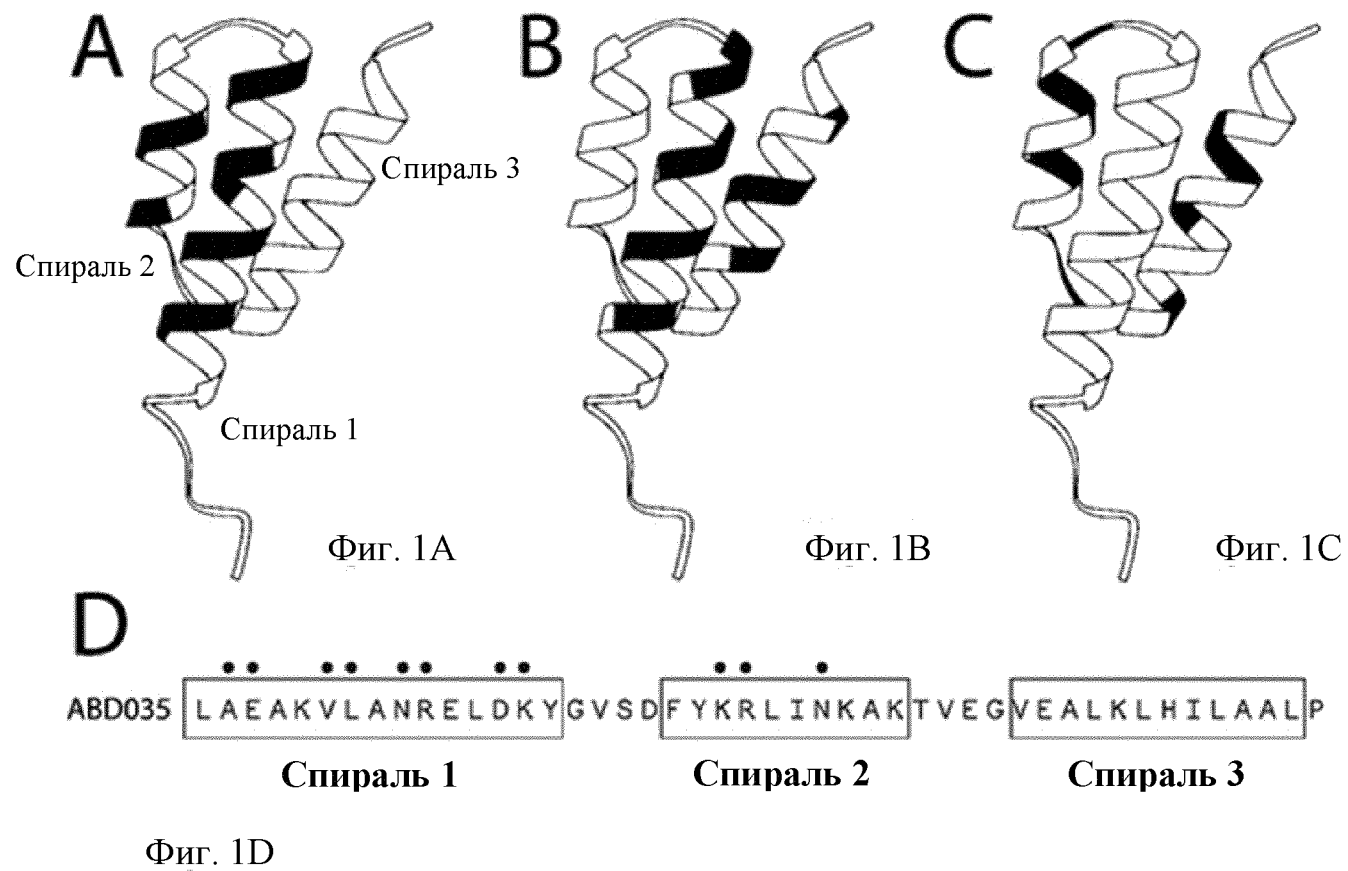
**22.** Фармацевтическая композиция по любому из пп. 20 или 21, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент, стабилизатор, добавку, буферный раствор и/или растворитель.

**23.** Терапевтический агент, содержащий биспецифический белок по любому из

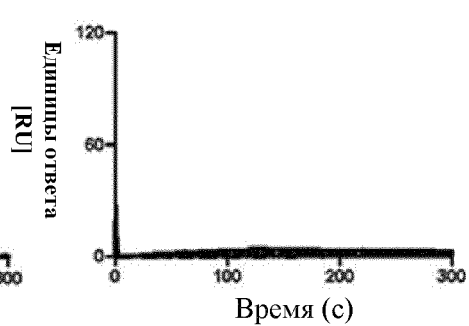
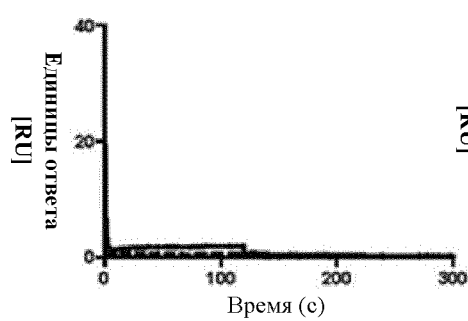
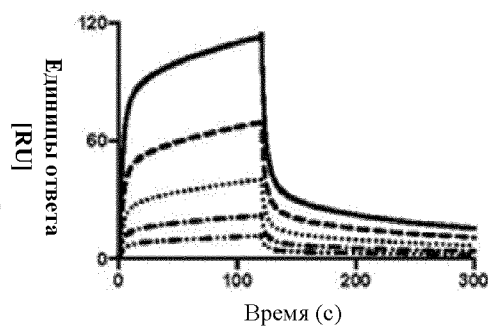
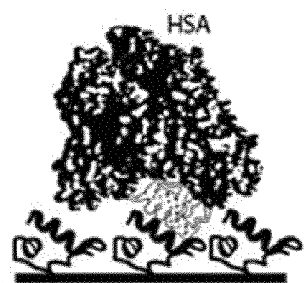
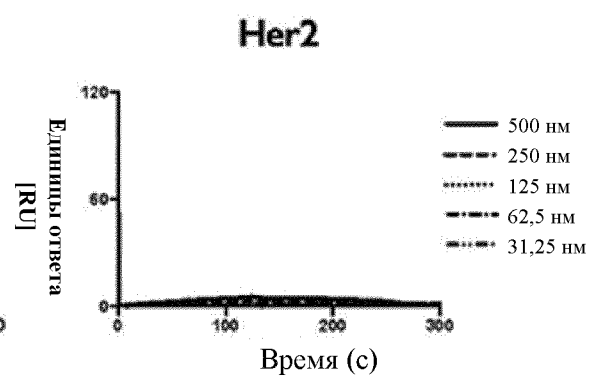
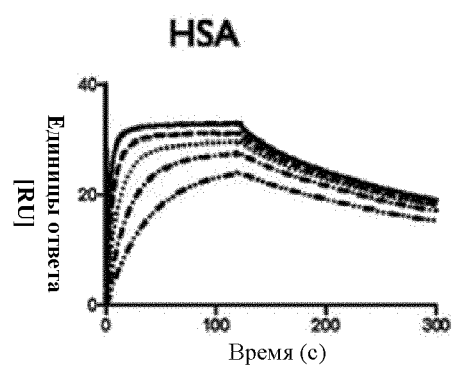
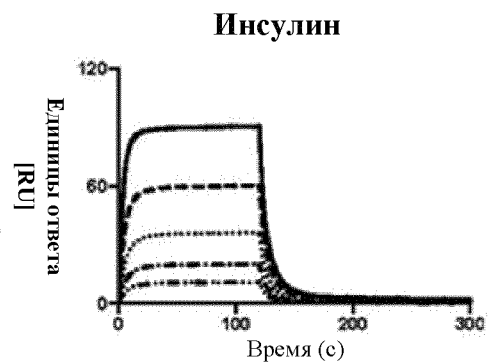
пп. 1-16 и цитотоксический агент, такой как цитотоксическая молекула, пептид, белок или радиоактивный изотоп.

**24.** Терапевтический агент по п. 23, где указанный цитотоксический агент представляет собой алкилирующее лекарственное средство, антрациклин, антиметаболит, алкалоид барвинка, этопозид, противоопухолевое лекарственное средство или противоопухолевый агент, экзотоксин, белок, инактивирующий рибосому, или ингибитор протеинкиназы.

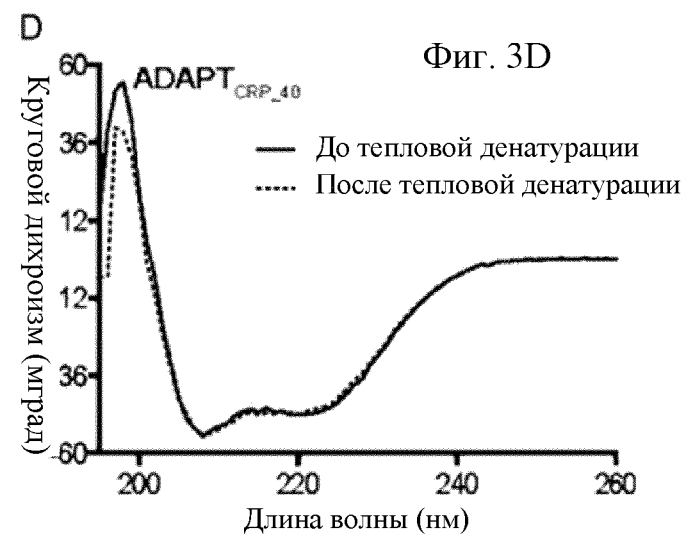
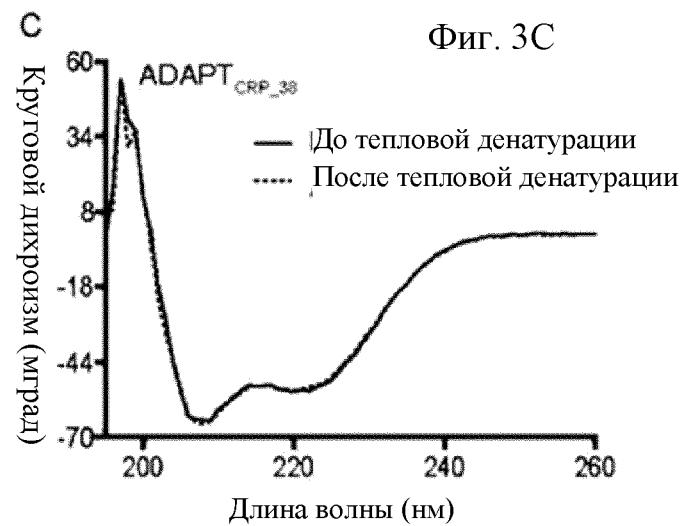
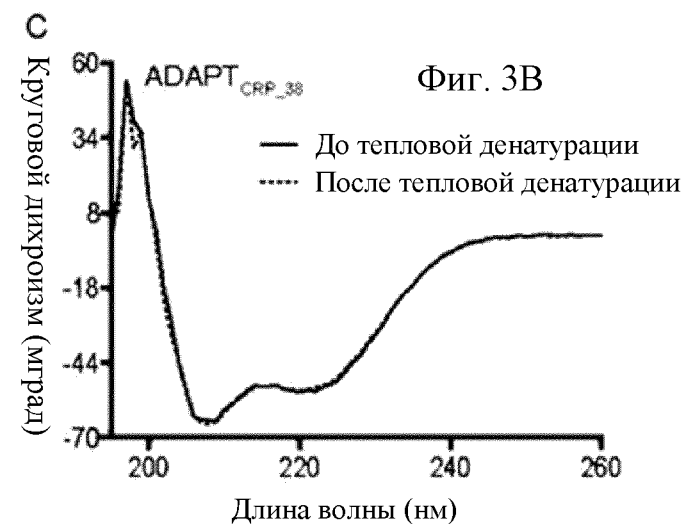
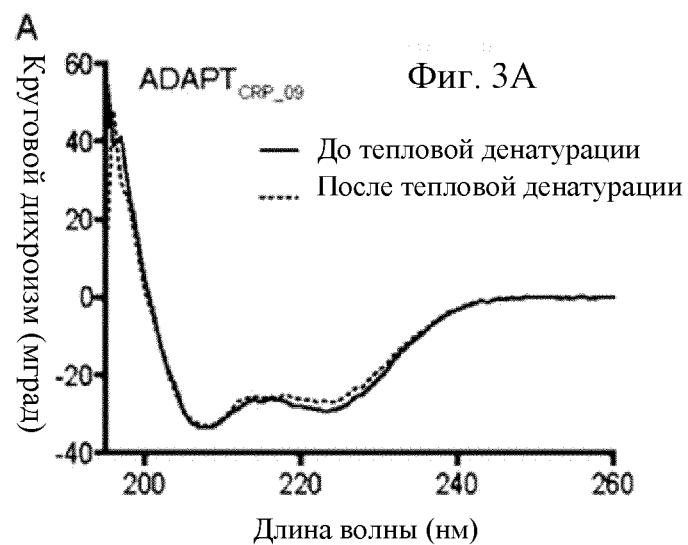
**25.** Терапевтический агент по п. 23, где цитотоксический радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{58\text{m}}\text{Co}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$  и  $^{211}\text{At}$ .

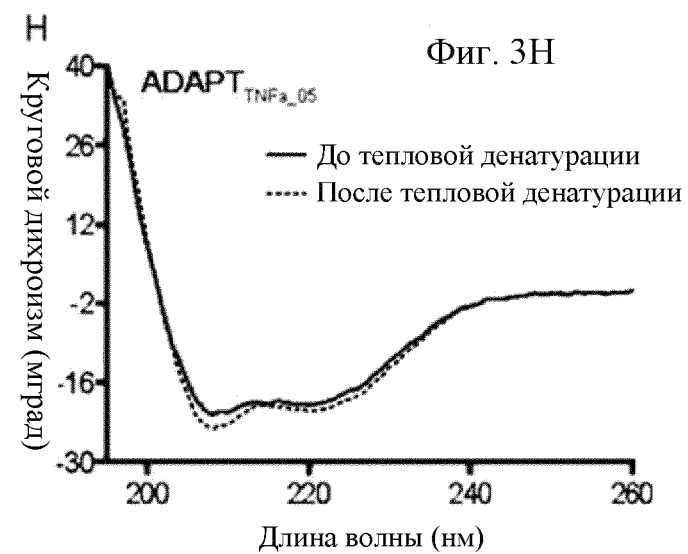
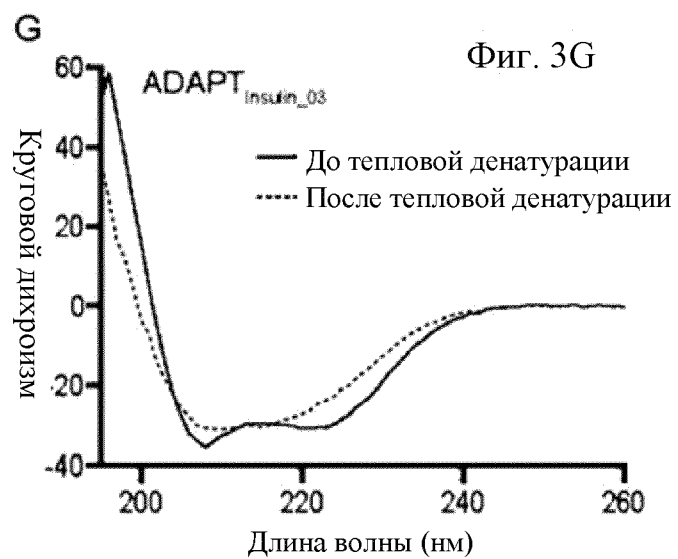
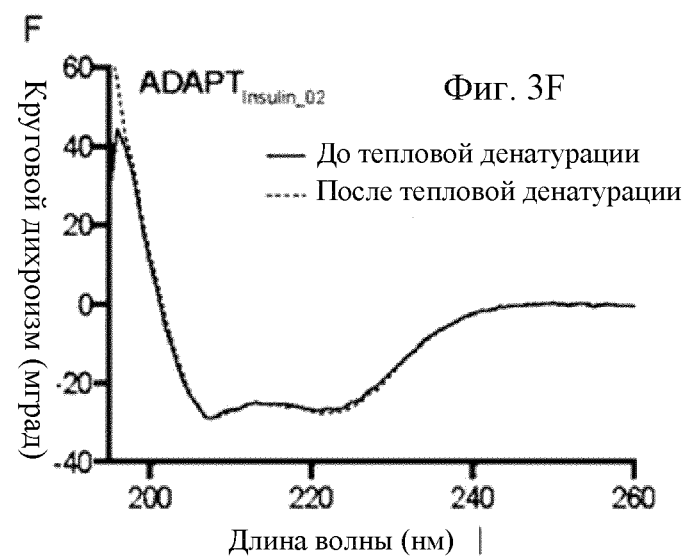
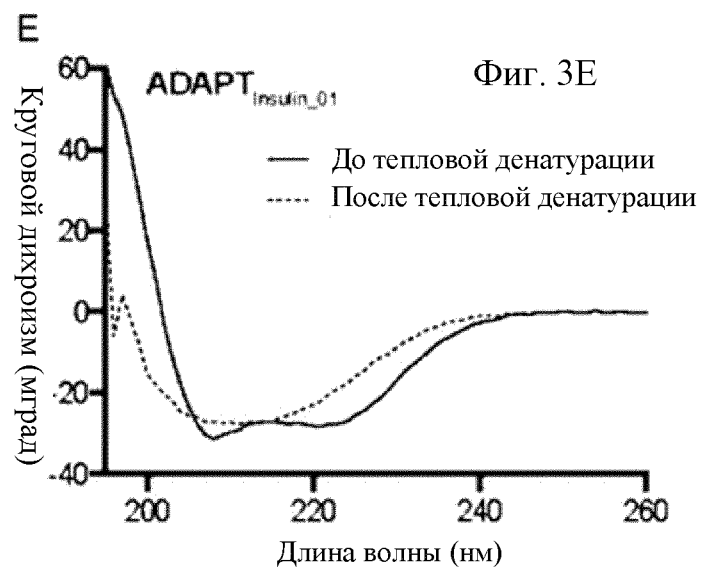


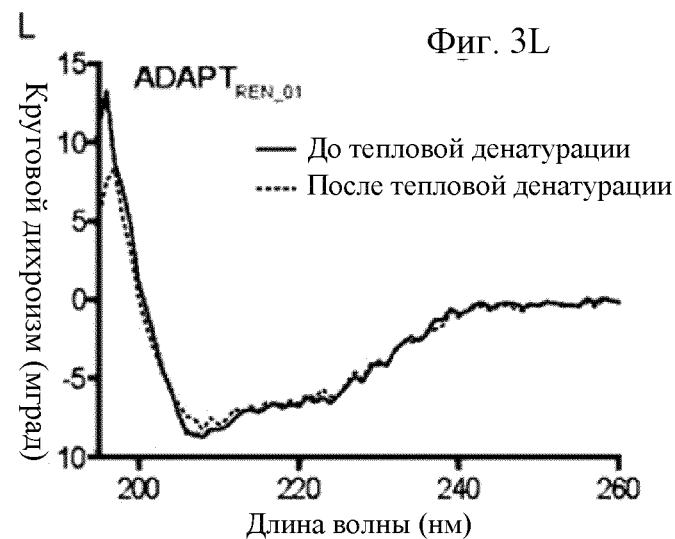
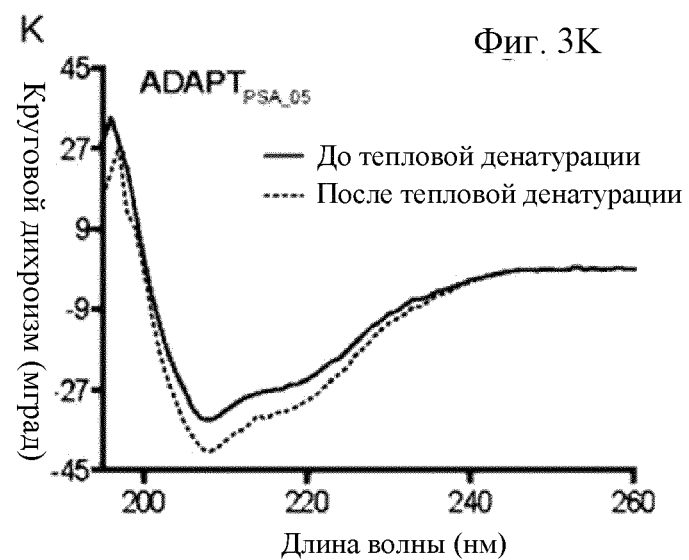
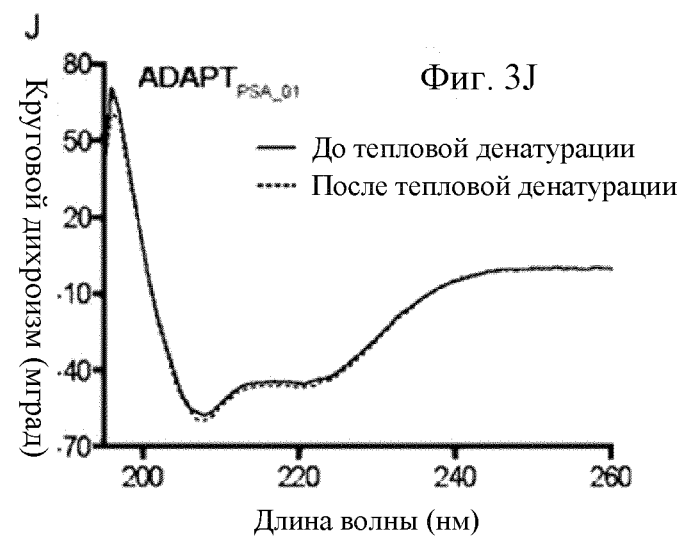
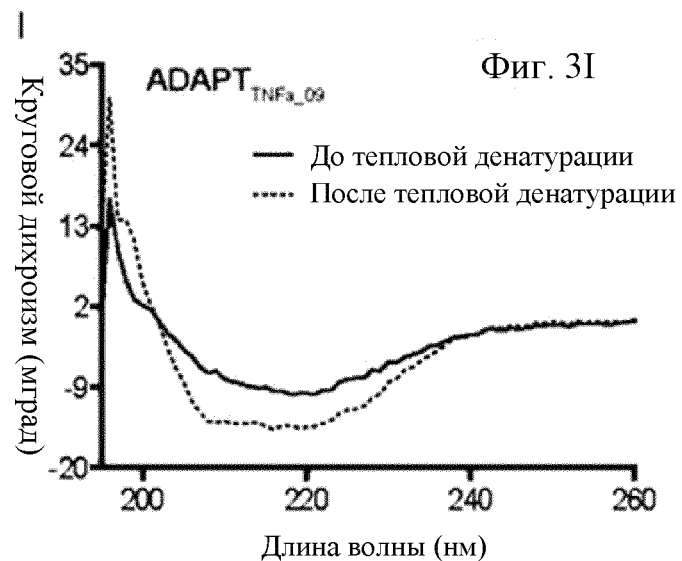
Фиг. 2А

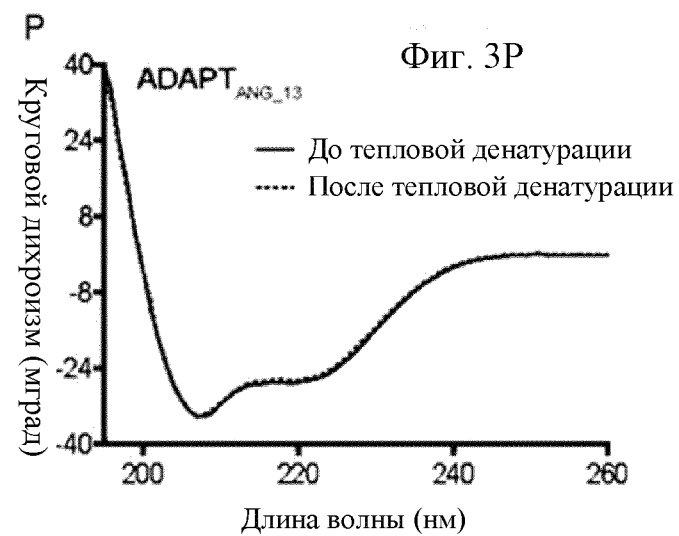
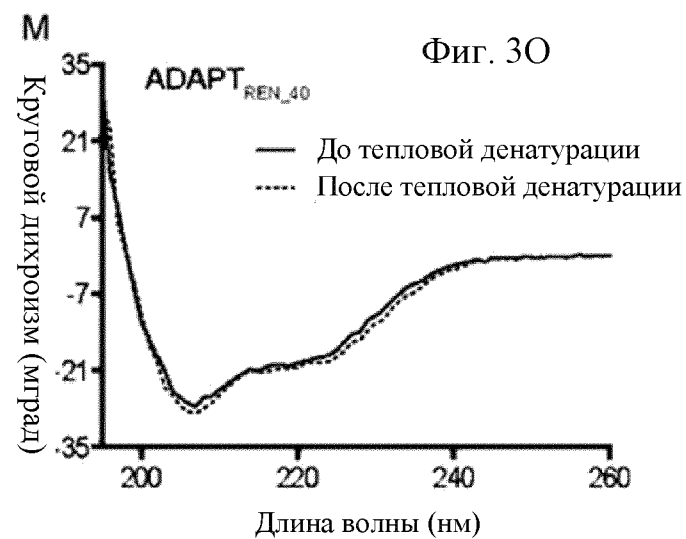
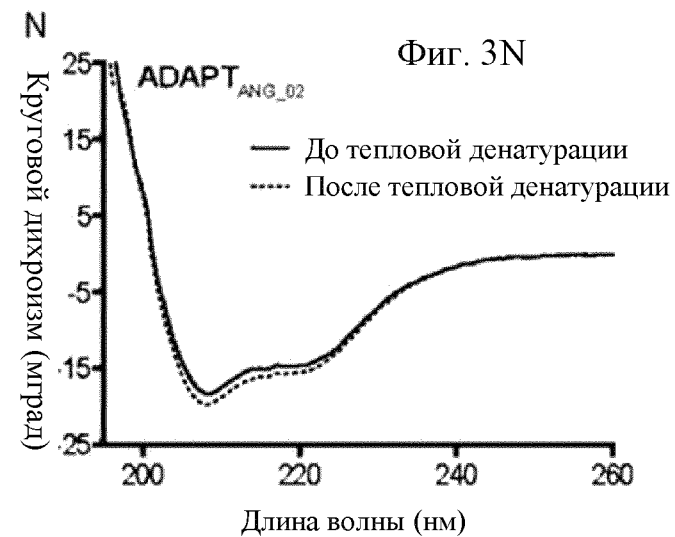
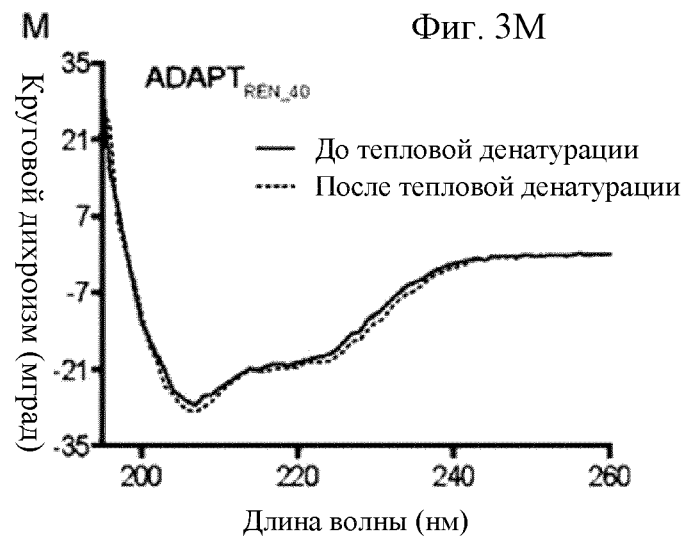


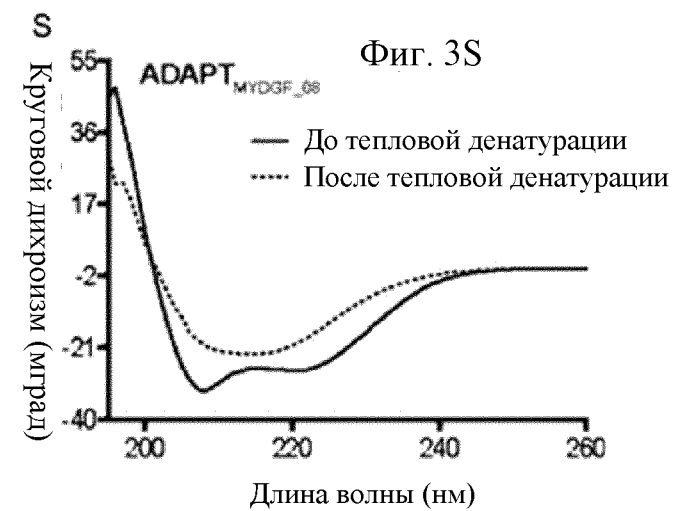
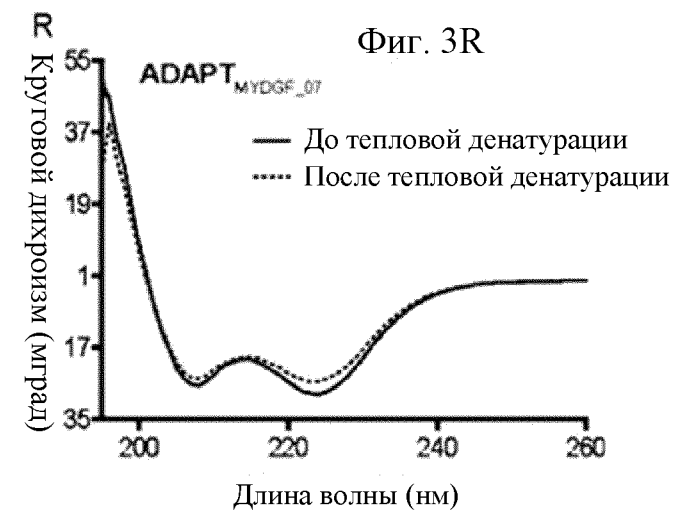
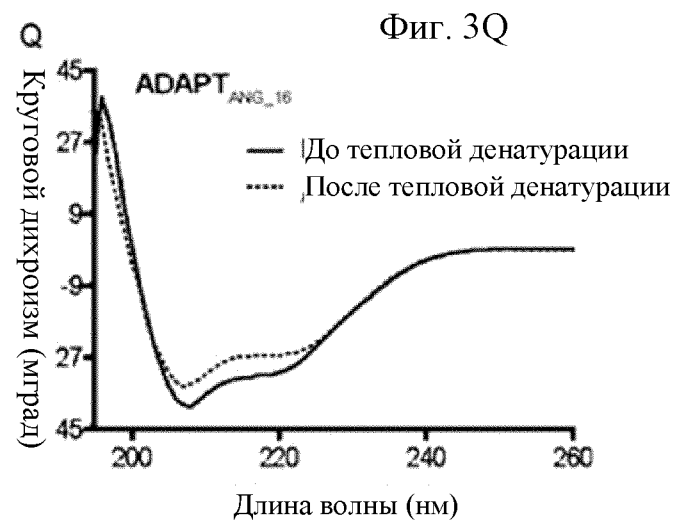
Фиг. 2В

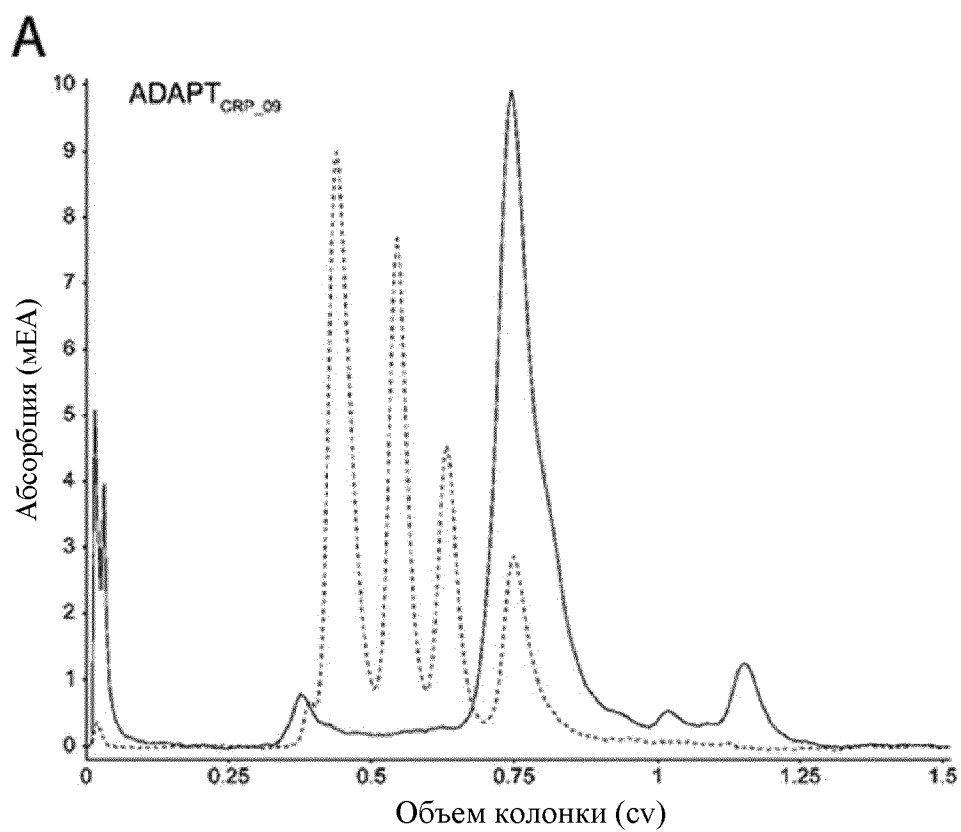




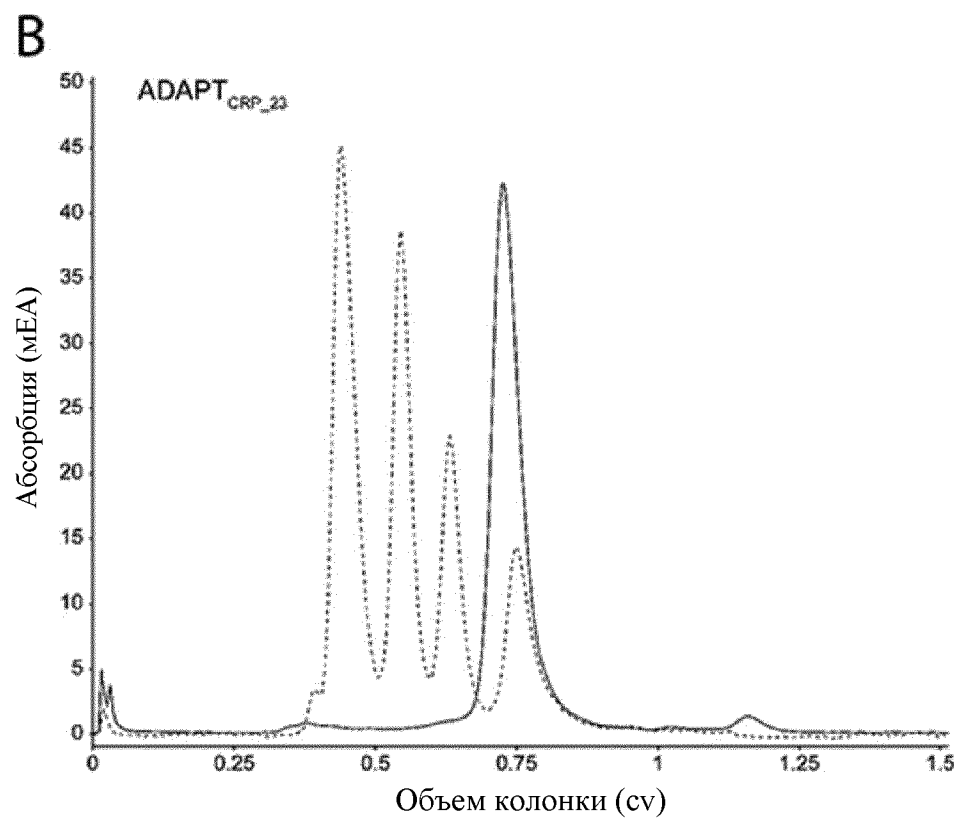




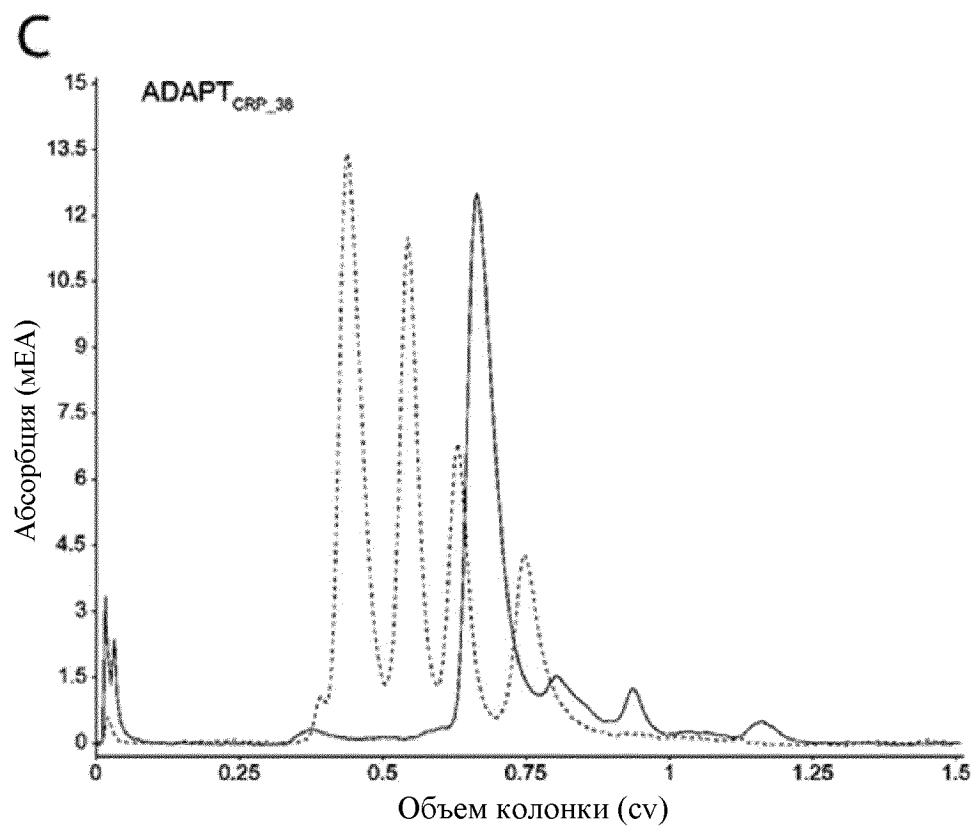




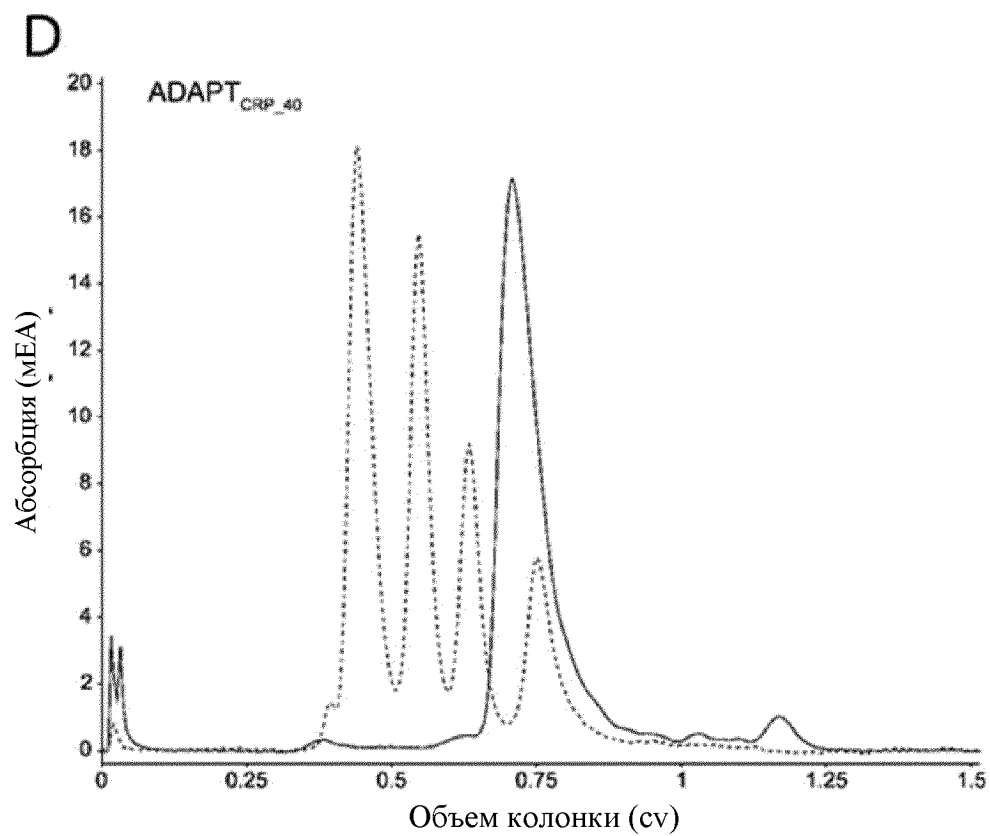
Фиг. 4А



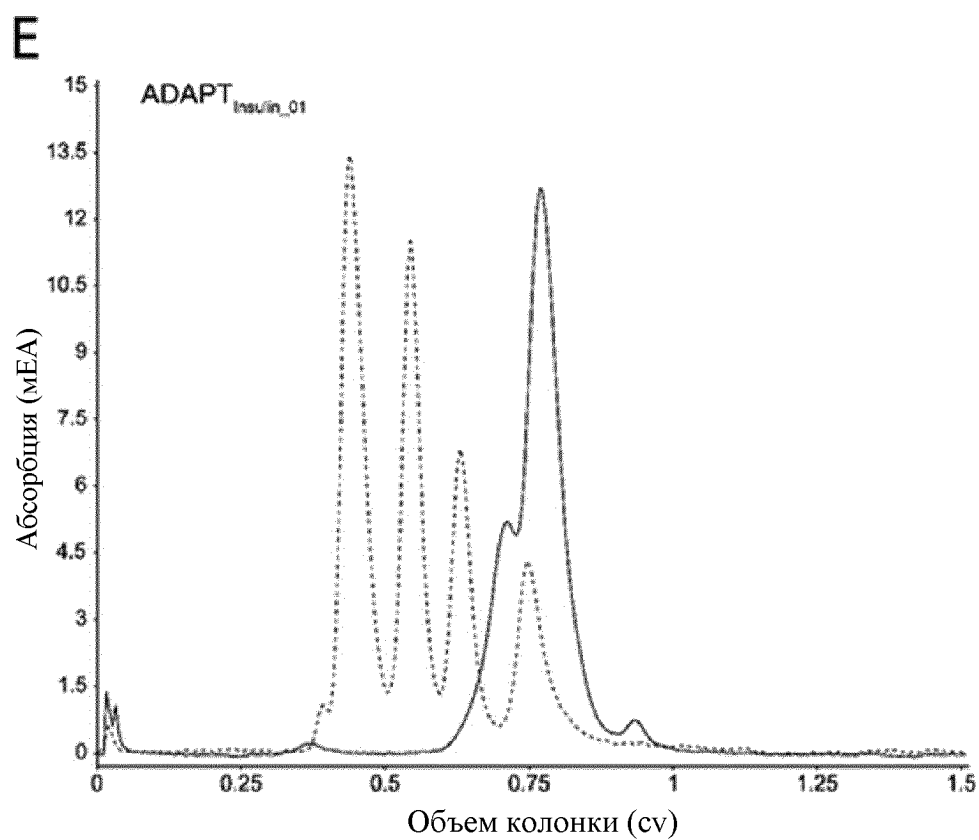
Фиг. 4В



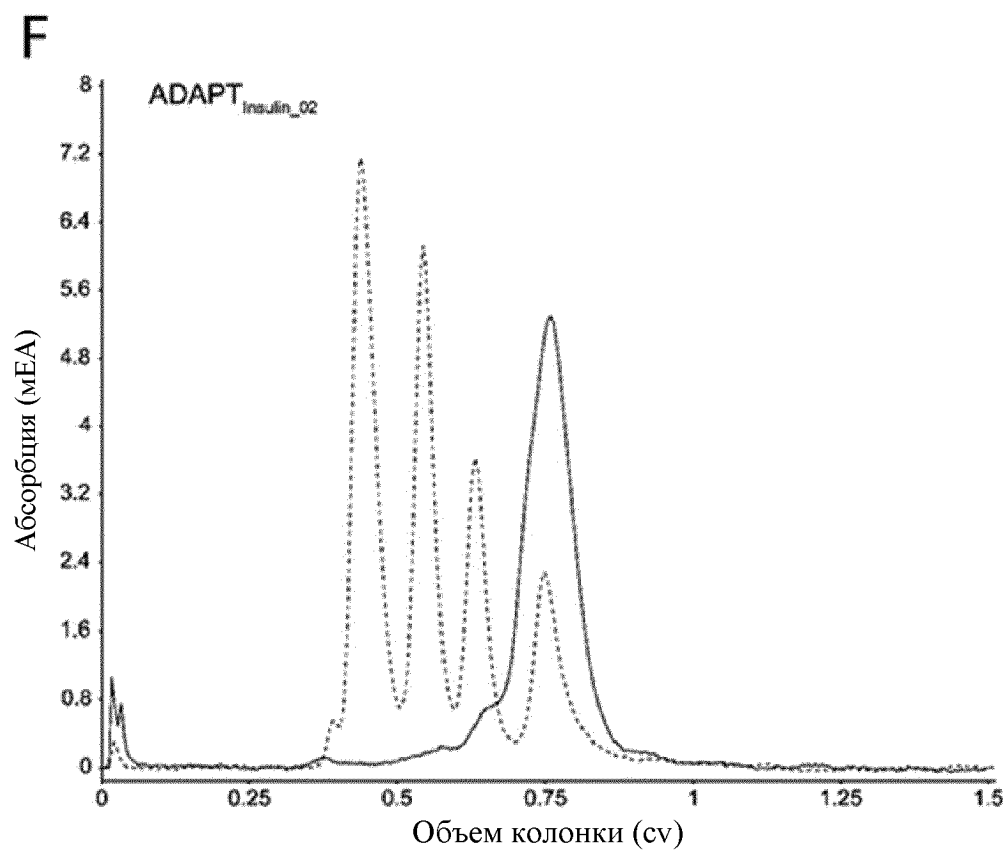
Фиг. 4C



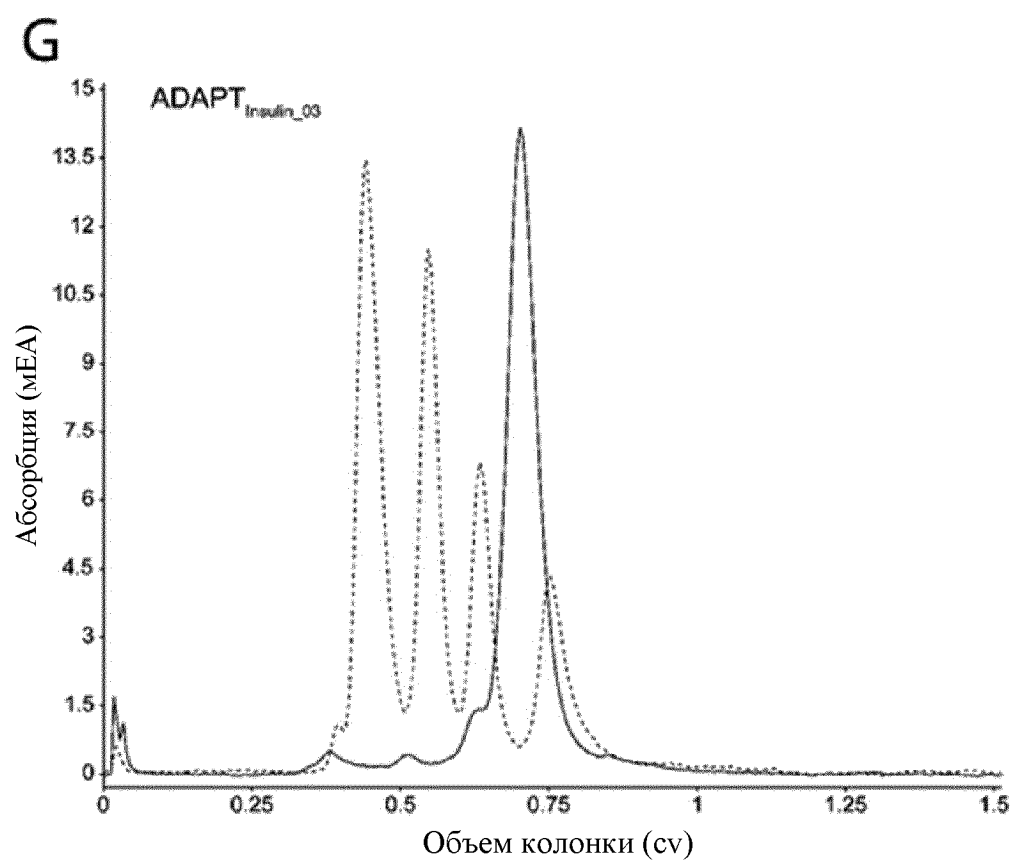
Фиг. 4D



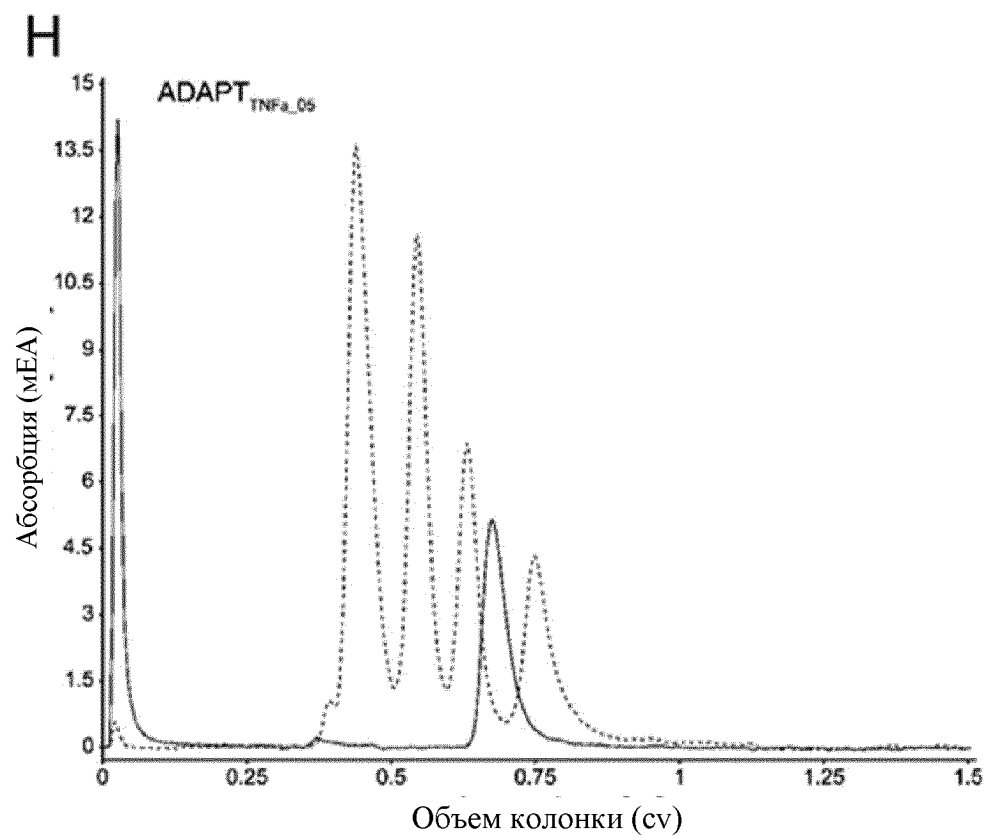
Фиг. 4Е



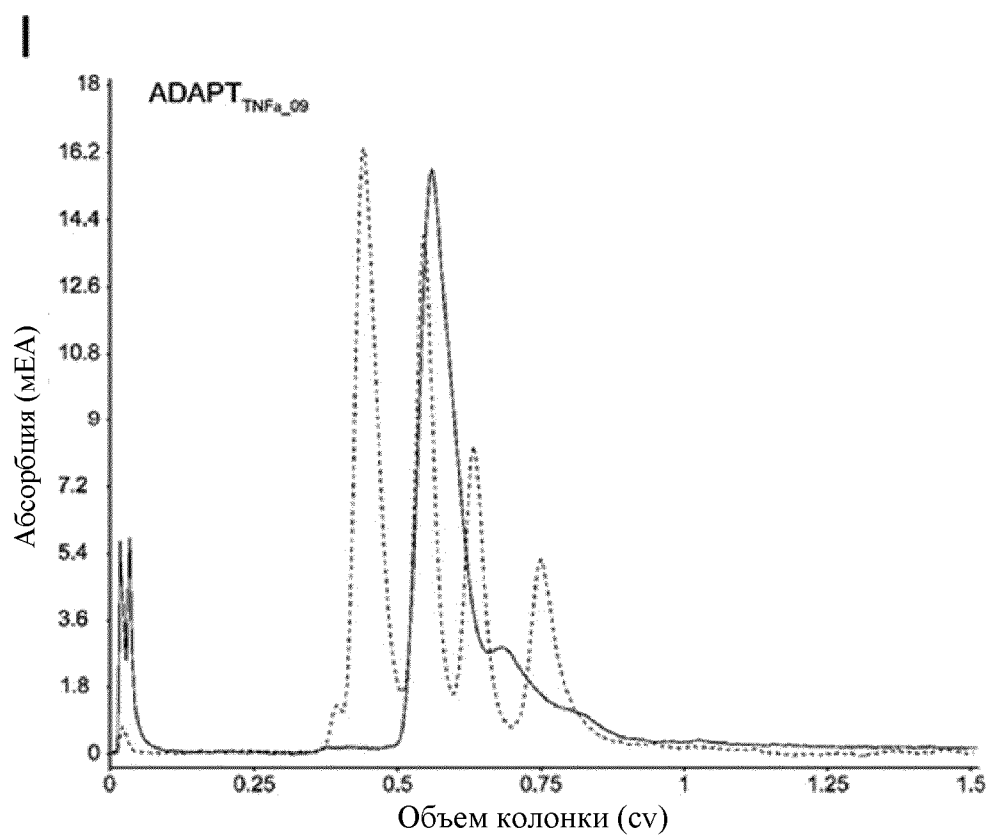
Фиг. 4F



Фиг. 4G



Фиг. 4H



Фиг. 4I

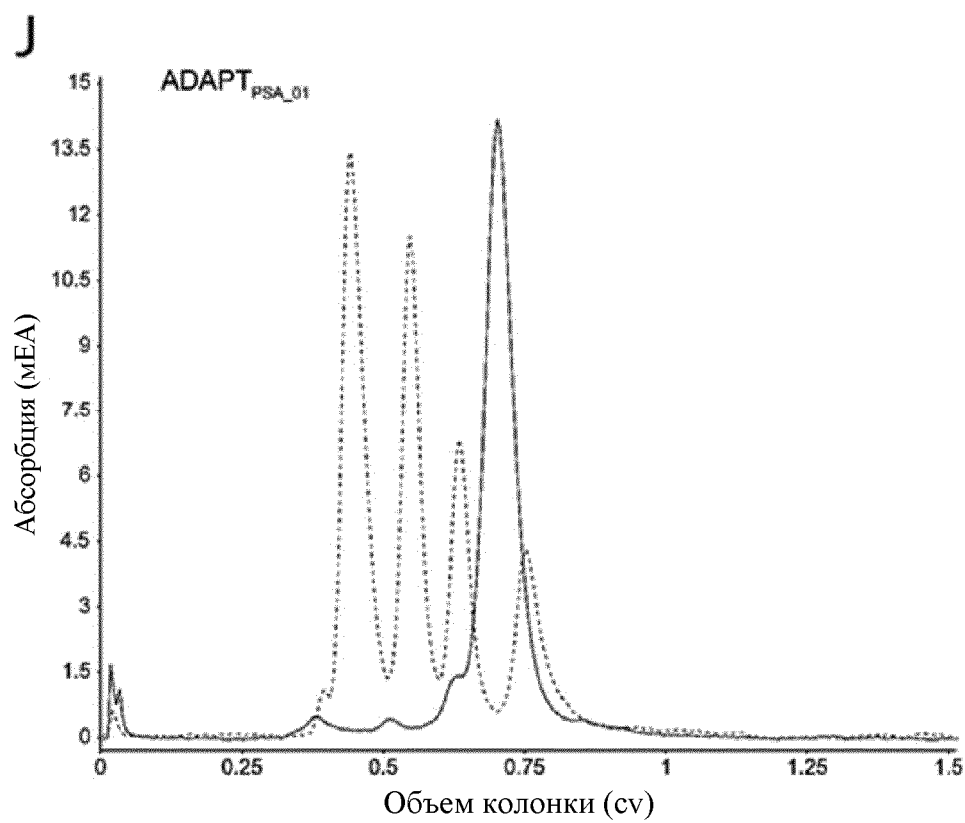
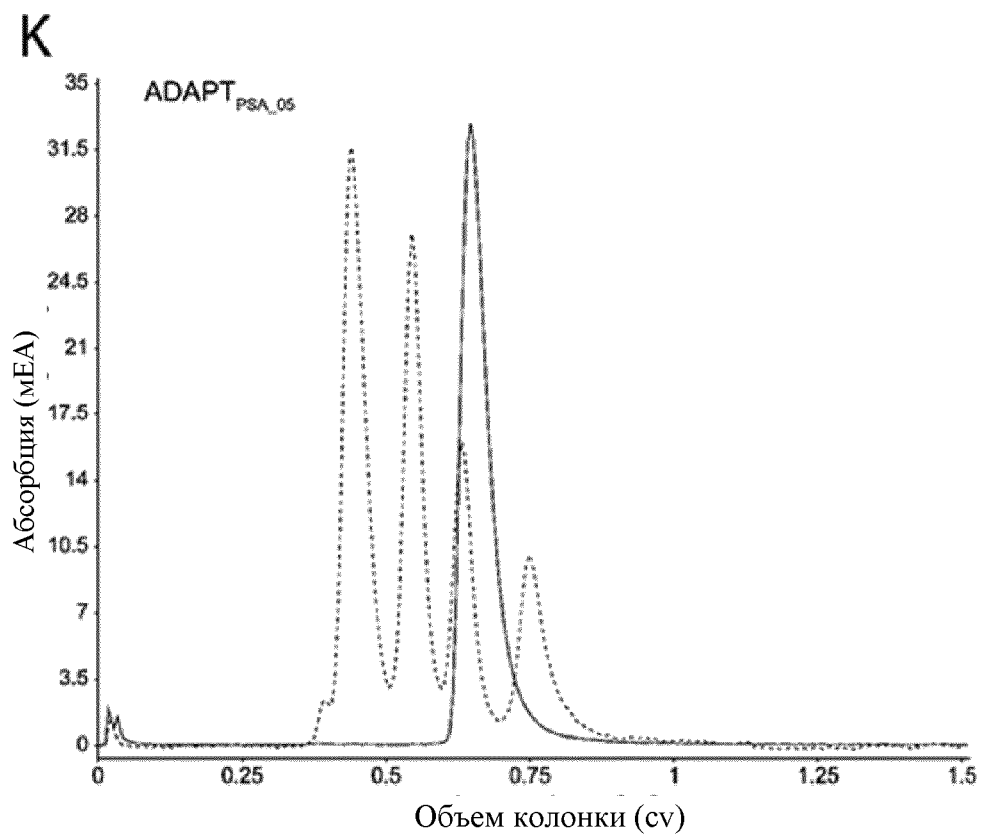
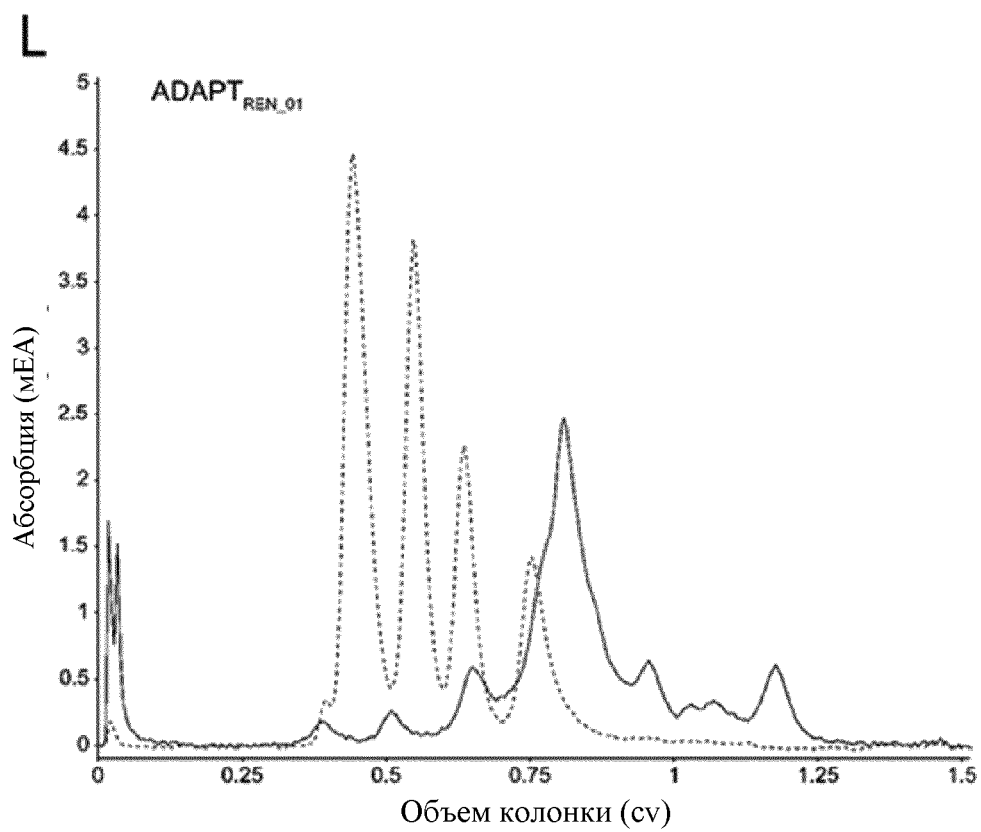


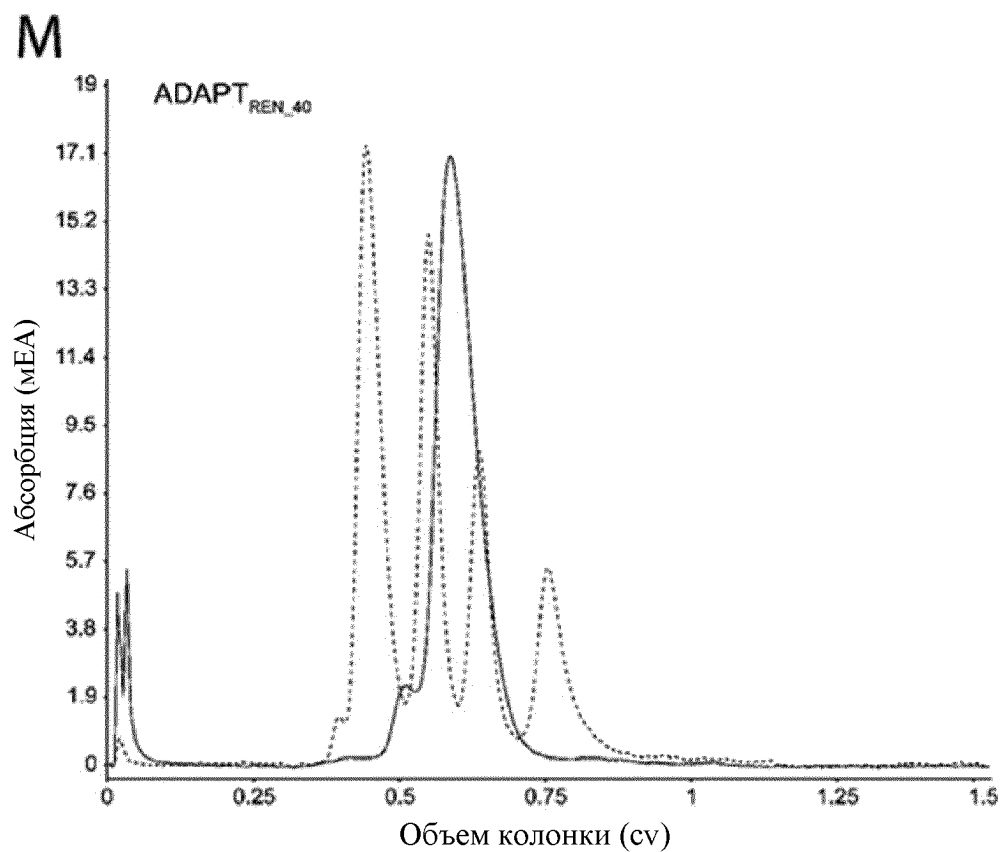
Fig. 4J



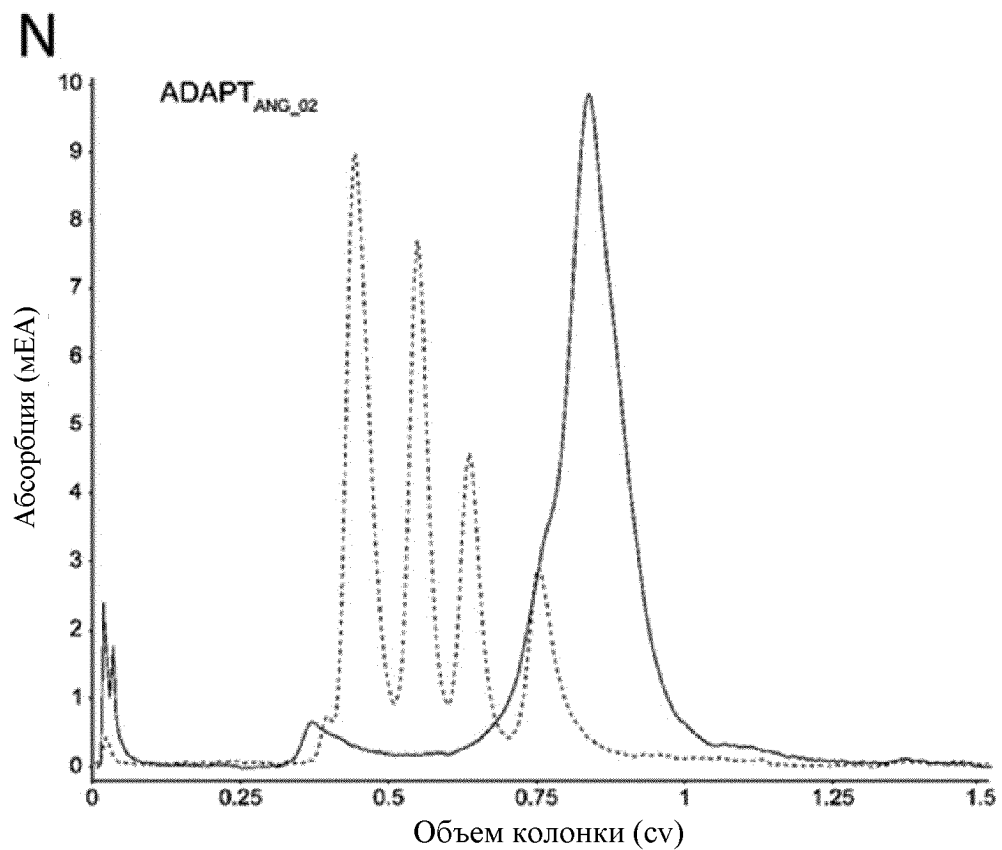
Фиг. 4К



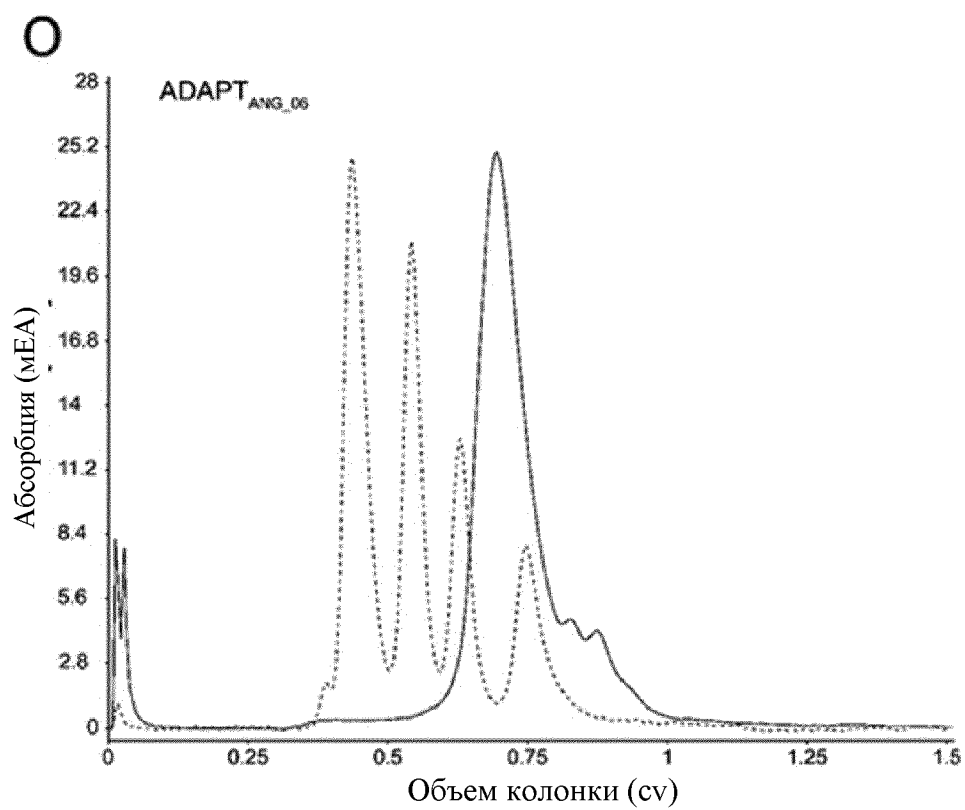
Фиг. 4Л



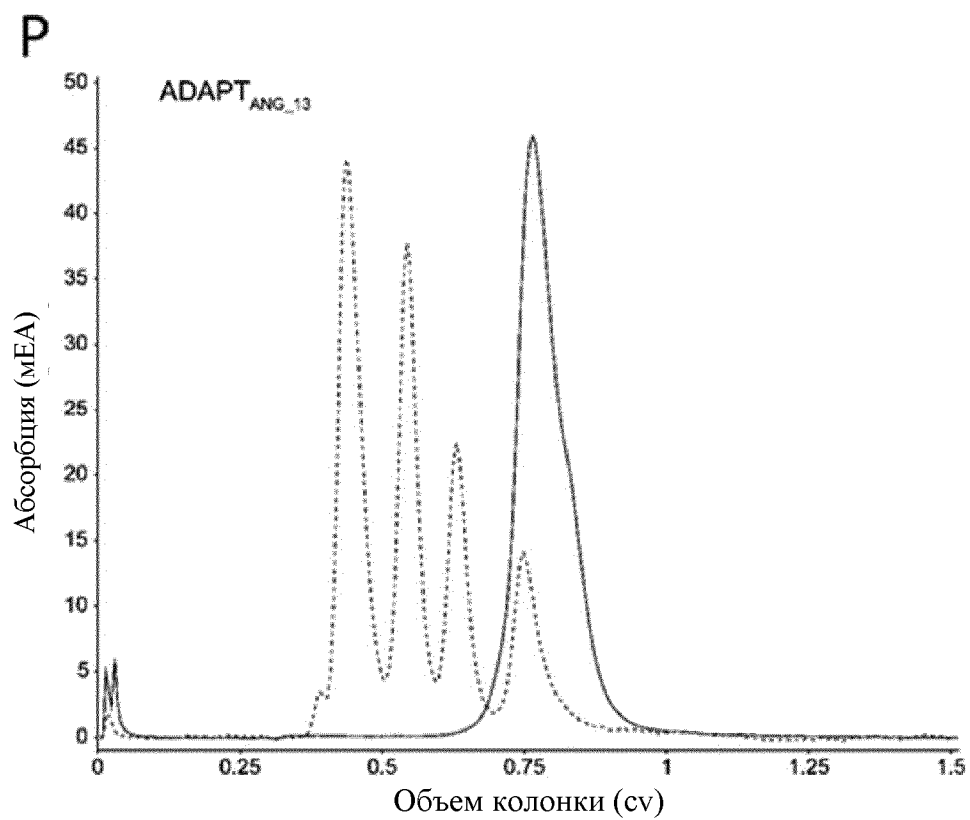
Фиг. 4М



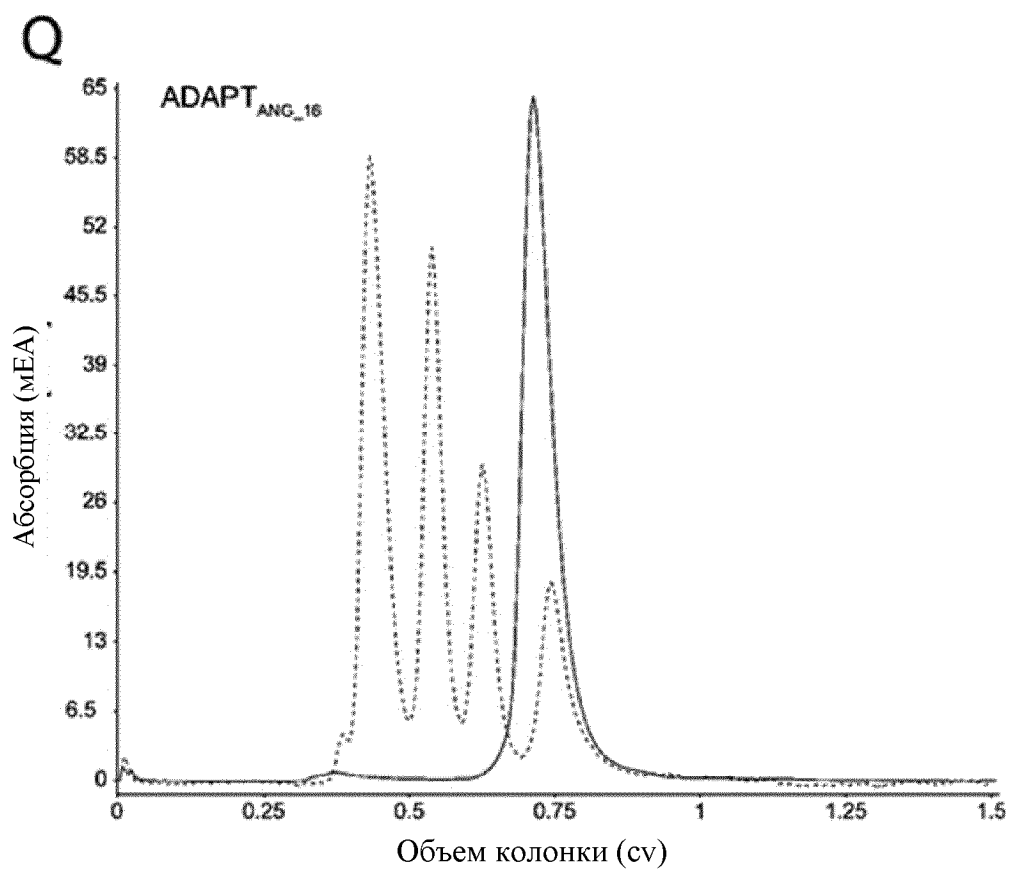
Фиг. 4N



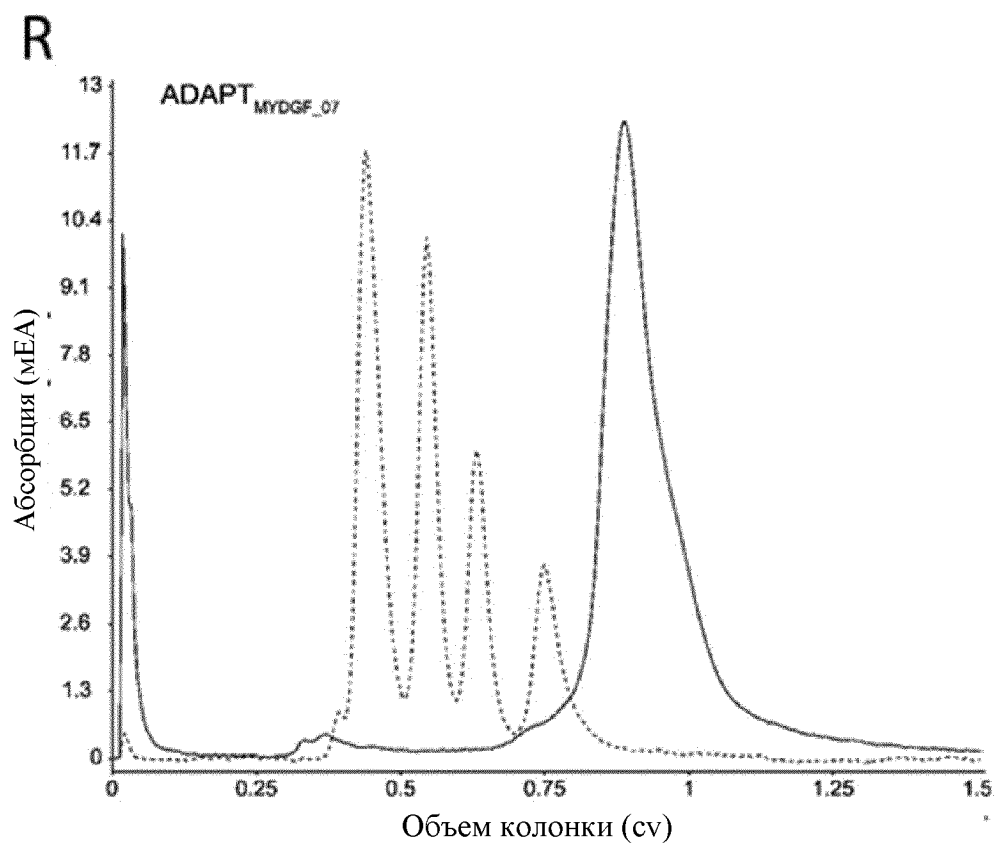
Фиг. 4О



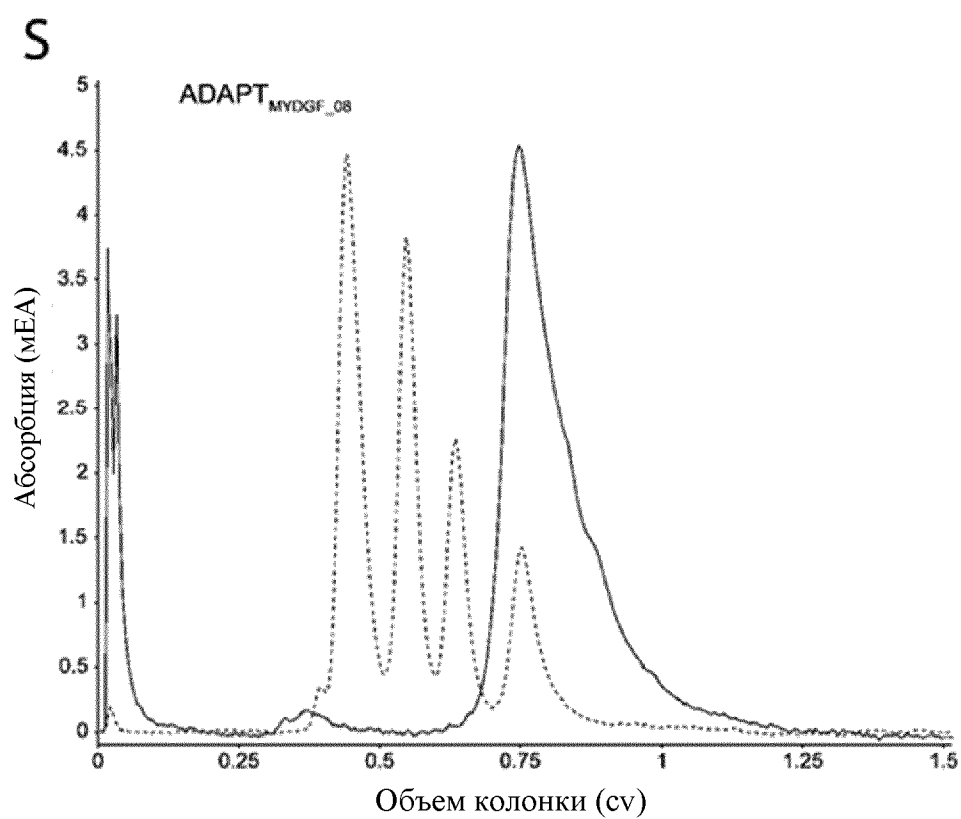
Фиг. 4Р



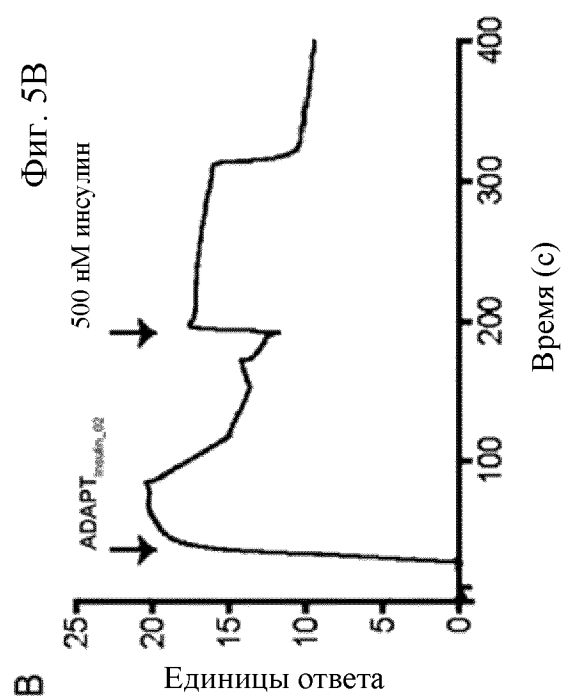
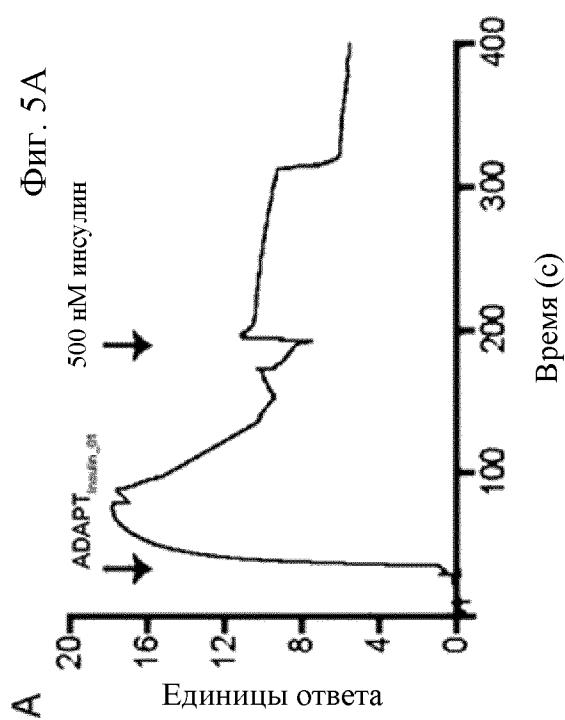
Фиг. 4Q

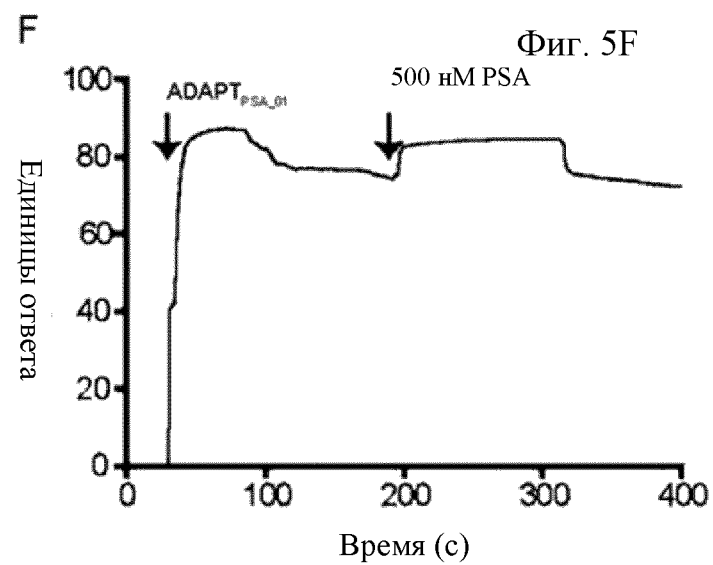
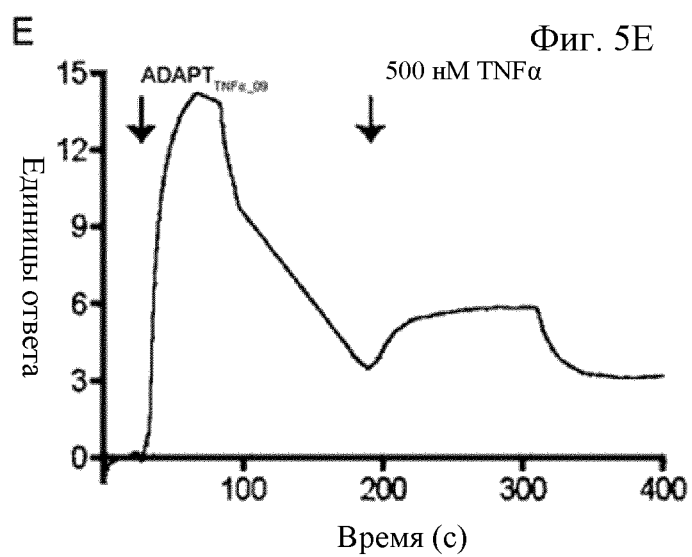
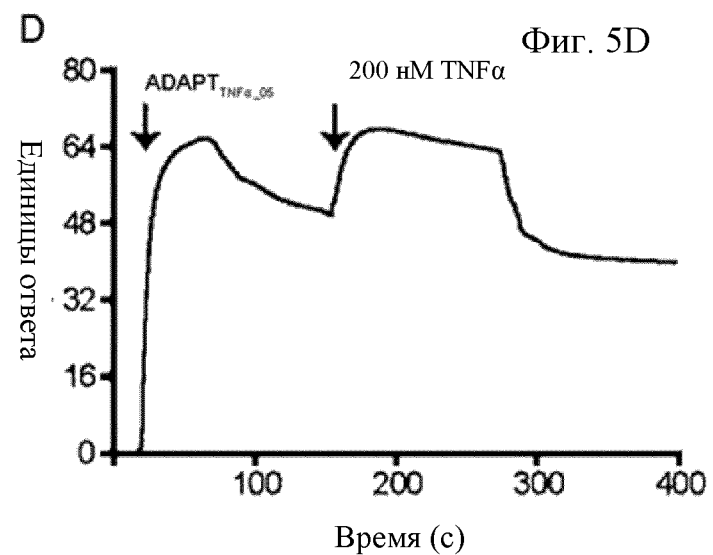
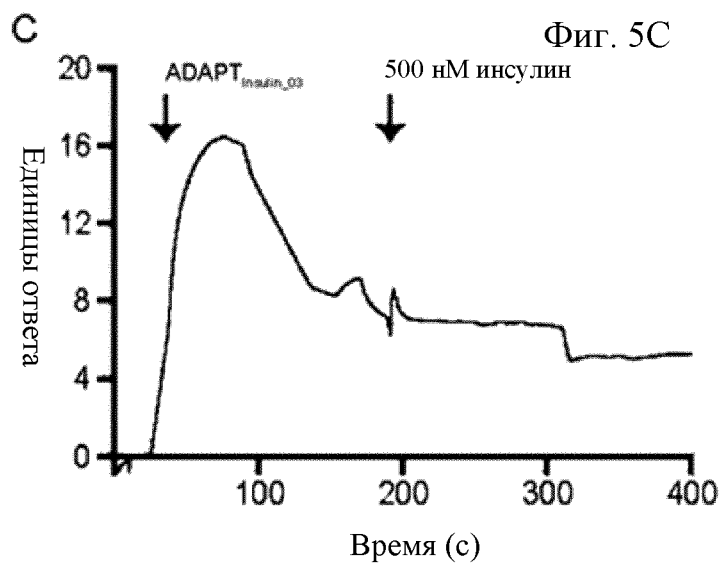


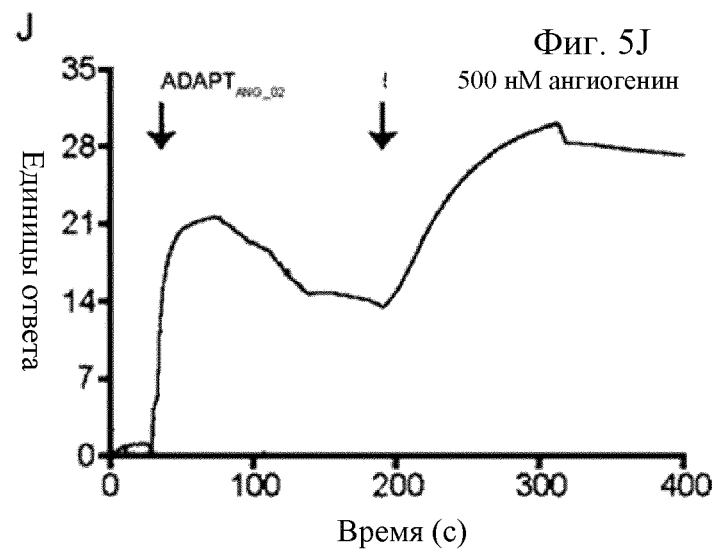
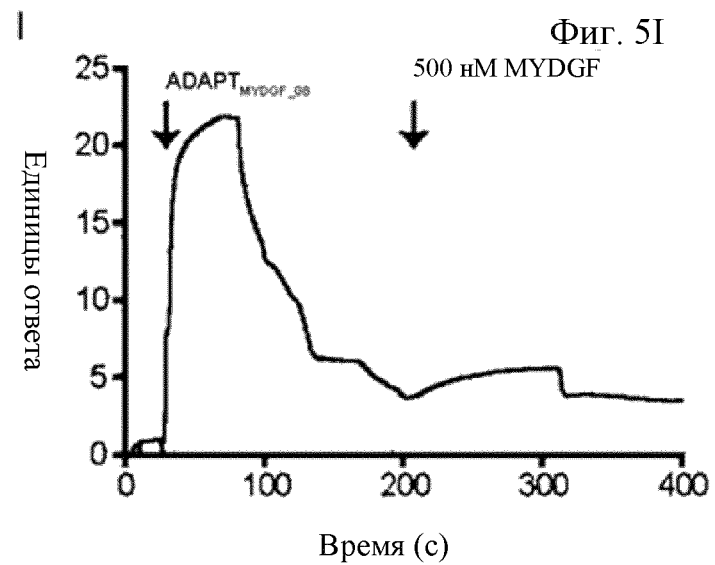
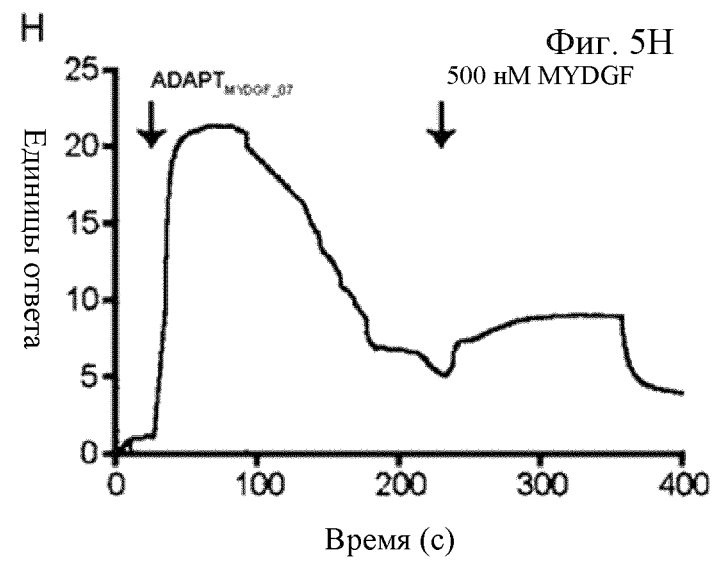
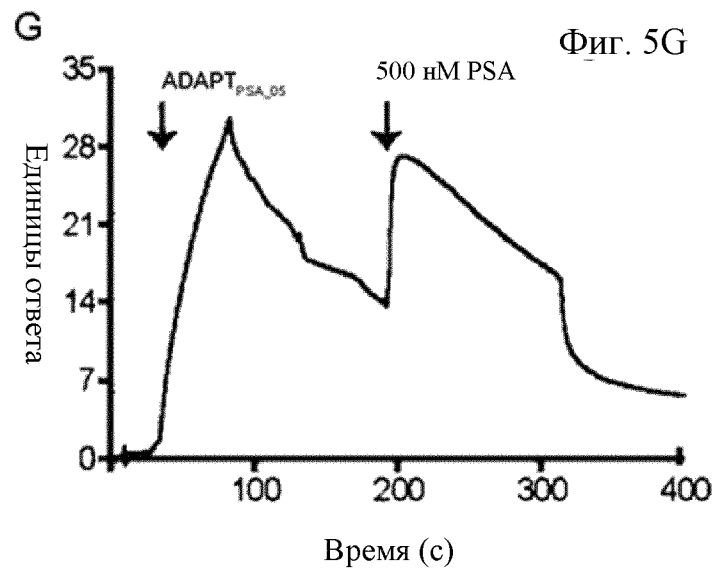
Фиг. 4R

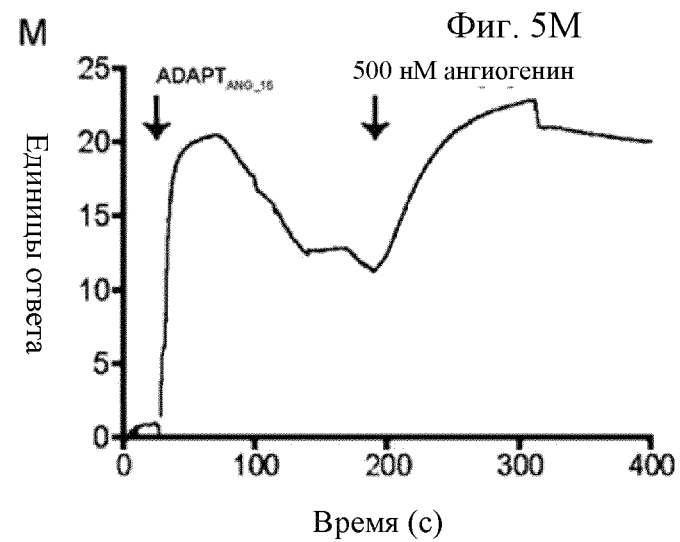
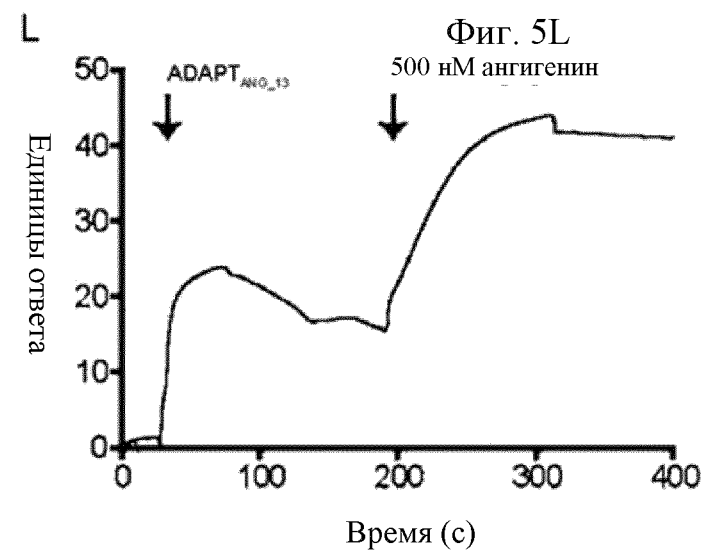
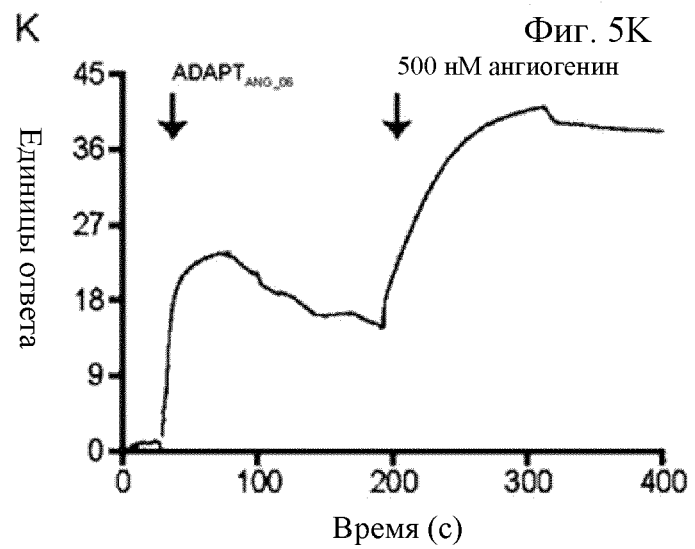


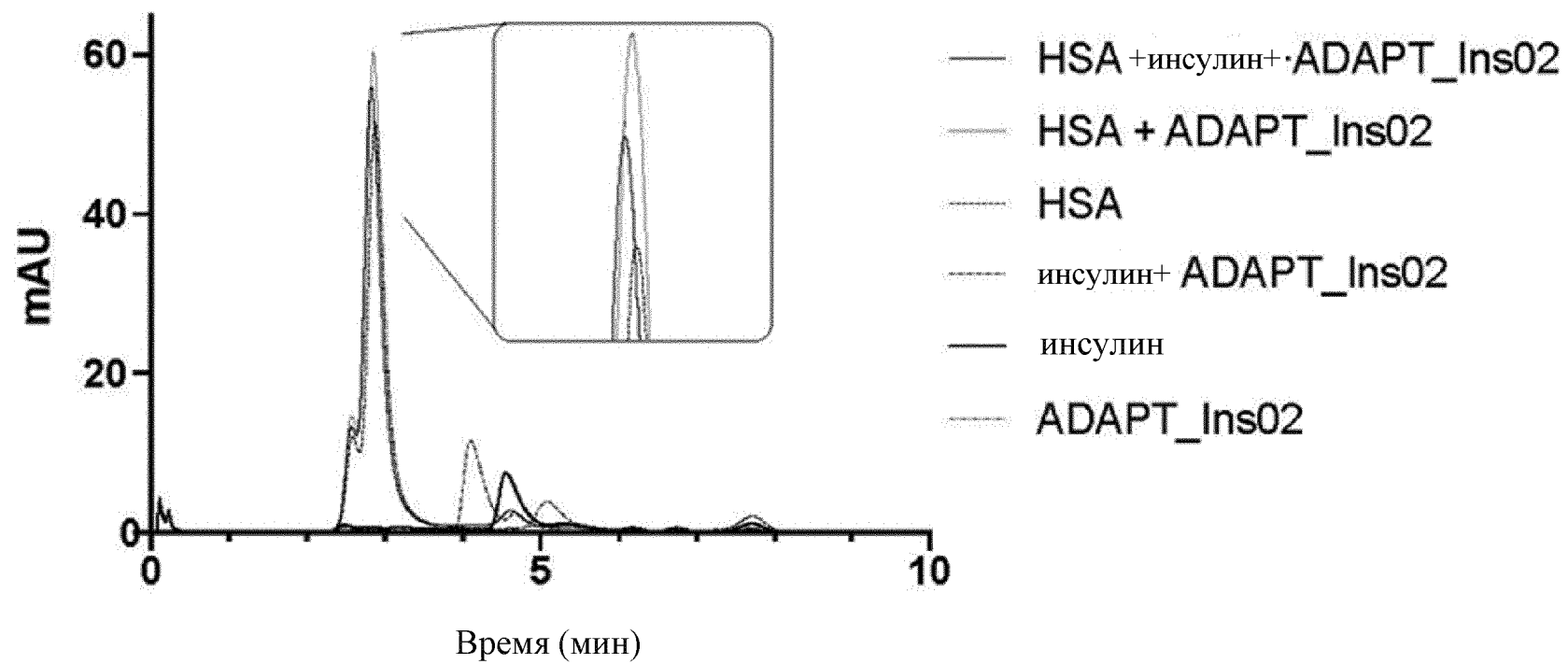
Фиг. 4S











Фиг. 6

|                | Спираль 1             | Спираль 1                     | Спираль 1 |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------|
|                | 10                    | 20                            | 30        |
| G148-GA1       | LAKAKADALKEFNKYGV     | -SDYYKNLINNAKTVEGVKDLQAQVVES  |           |
| G148-GA2       | LAEAKVLANRELDKYGV     | -SDYHKNLINNAKTVEGVKDLQAQVVES  |           |
| G148-GA3 (ABD) | LAEAKVLANRELDKYGV     | -SDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA  |           |
| ALB8-GA        | LKNAKEDAI AELKKAGITS  | SDFYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKA   |           |
| ALB1-GA        | LKNAKEDAI AELKKAGITS  | SDFYFNAINKAKTVEGANALKNEILKA   |           |
| ALB8-uGA       | LKLTKEEA EKALKKLGITSE | FILNQIDKATSREGLESLVQTIKQS     |           |
| ALB1B-uGA      | LQEAKDKAIQEAKANGLTS   | KL LKN IENAKTPESA KSFAEELIKS  |           |
| L3316-GA1      | LKNAKEEAIKELKEAGITS   | DL YFSLINKAKTVEGV EALKNEILKA  |           |
| L3316-GA2      | LKNAKEDAIKELKEAGISS   | DIYFDAINKAKTVEGV EALKNEILKA   |           |
| L3316-GA3      | LKNAKEAAIKELKEAGITA   | EYLFNLINKAKTVEGVESLKNEILKA    |           |
| L3316-GA4      | LKNAKEDAIKELKEAGITS   | DIYFDAINKAKTIEGV EALKNEILKA   |           |
| DG12-GA1       | LDNAKNAALKEFD RYGV    | -SDYYKNLINNAKTVEGIMELQAQVVES  |           |
| DG12-GA2       | LSEAKEMAIRELDANGV     | -SDFYKDKIDDAKTVEGVVALKDLILNS  |           |
| MAG-GA1        | LAKLAADTDLDLDVAKI     | IND-YTTKVENAKTAEDVKKIFEE--SQ  |           |
| MAG-GA2        | LAKAKADAIEILKKYGI     | -GDYYIKLINN GKTAEGVTALKDEIL-- |           |
| ZAG-GA         | LLEAKEAAINELKQYGI     | -SDYYVTLINKAKTVEGVNALKAEILSA  |           |
| PSD-1          | LAQAKEAAIKELKQYGI     | -GDYYIKLINNAKTVEGVESLKNEILKA  |           |
| ABD*           | LAEAKVLALRELDKYGV     | -SDYYKDLIDKAKTVEGVKALIDEILAA  |           |
| ABD035         | LAEAKVLANRELDKYGV     | -SDFYKRLINKAKTVEGV EALKLHILAA |           |
| ABDcon         | LKEAKEKAIEELKKAGITS   | SDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA   |           |

Фиг. 7