

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390459** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.01**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.07.30**

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН**

(31) **63/059,026**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.07.30**

**Дженкинс Эмма, Адам Эстель,**

(33) **US**

**Стэнли Эмма, Басран Амрик (GB),**

(86) **PCT/EP2021/071421**

**Винсент Мэттью П. (US), Гомес Бруно**

(87) **WO 2022/023540 2022.02.03**

**(PT)**

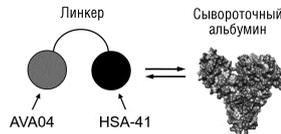
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ЭВАКТА ЛАЙФ САЙЕНСИС  
ЛИМИТЕД (GB)**

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В изобретении в некоторых вариантах осуществления представлен рекомбинантно сконструированный вариант полипептидов стефина (полипептиды AFFIMER®), который связывается с человеческим сывороточным альбумином и продлевает время полужизни полипептидов. Также в изобретении в некоторых вариантах осуществления представлены композиции, содержащие полипептиды, способы применения полипептидов и способы получения полипептидов.



**202390459**

**A1**

**A1**

**202390459**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577262EA/061

### ПОЛИПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН

#### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет, в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e), по заявке US 63/059026, поданной 30 июля 2020 г., которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

#### Предпосылки создания изобретения

Человеческий сывороточный альбумин является основным белком, присутствующим в плазме крови человека. Он составляет примерно 50% от общего содержания белка у здоровых людей. Альбумин человека представляет собой небольшой глобулярный белок (молекулярная масса: 66,5 кДа), состоящий из одной цепи из 585 аминокислот, организованных в три повторяющихся гомологичных домена (сайты I, II и III). Каждый домен состоит из двух отдельных субдоменов (А и В). Человеческий сывороточный альбумин является носителем для множества малых молекул и белков, регулирует онкотическое давление и выполняет большую часть антиоксидантных функций в организме. Часто он используется для улучшения доставки лекарственных средств и поддержания клеточной культуры.

#### Сущность изобретения

В некоторых аспектах в настоящей заявке представлена платформа для продления времени полужизни, основанная на рекомбинантно сконструированном варианте полипептидов стефина (полипептиды AFFIMER®), которые связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином (HSA)). Был разработан ряд полипептидов AFFIMER®, связывающих человеческий сывороточный альбумин (называемых анти-HSA полипептидами AFFIMER®), с диапазоном аффинностей связывания. Эти анти-HSA полипептиды AFFIMER® перекрестно реагируют с другими видами, такими как мышь и яванский макак. В исследованиях фармакокинетики (PK) *in vivo* было показано, что эти полипептиды контролируемым образом продлевают время полужизни в сыворотке любых других полипептидов AFFIMER®, с которыми они конъюгированы (например, в виде единого генетического слияния), которые могут быть получены, например, в бактериальных клетках (например, *Escherichia coli*). Представленные в настоящей заявке связывающие сывороточный альбумин полипептиды AFFIMER®, также можно использовать для продления времени полужизни других полипептидов, таких как терапевтические белки.

Таким образом, некоторые аспекты настоящего изобретения обеспечивают полипептиды AFFIMER®, которые связываются с сывороточным альбумином, таким как человеческий сывороточный альбумин (HSA). В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA со значением  $K_d$   $1 \times 10^{-6}$  М или менее при pH 7,4, а при pH 6 связываются с HSA со значением  $K_d$ , которое по меньшей мере на половину  $\log$  меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее при pH 7,4,  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  М или менее при pH 7,4 или  $K_d$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления полипептиды при pH 6 связываются с HSA со значением  $K_d$ , которое по меньшей мере на один log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, по меньшей мере на 1,5 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, по меньшей мере на 2 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, или по меньшей мере на 2,5 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 10 часов, более 24 часов, более 48 часов, более 72 часов, более 96 часов, более 120 часов, более 144 часов, более 168 часов, более 192 часов, более 216 часов, более 240 часов, более 264 часов, более 288 часов, более 312 часов, более 336 часов или более 360 часов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 50%, более 60%, более 70% или более 80% от времени полужизни HSA в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают аминокислотную последовательность, представленную в общей формуле (I): FR1-(Xaa)<sub>n</sub>-FR2-(Xaa)<sub>m</sub>-FR3 (I), где FR1 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с MIPGGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLA (SEQ ID NO: 1); FR2 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с GTNYYIKVRA GDNKYMHLKV FKSL (SEQ ID NO: 2); FR3 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с EDLVLTGYQV DKNKDELGTG F (SEQ ID NO: 3); и Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту, n представляет собой целое число от 3 до 20, и m представляет собой целое число от 3 до 20. В некоторых вариантах осуществления FR1 имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления FR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления FR2 имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR3 имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления FR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность представленного в настоящей заявке полипептида AFFIMER® представлена в общей формуле (II):

MIP-Xaa1-GLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA-(Xaa)<sub>n</sub>-Xaa2-TNYYIKVRAGDNKYMHLKVF-Xaa3-Xaa4-Xaa5-(Xaa)<sub>m</sub>-Xaa6-D-Xaa7-VLTGYQVDKNKDELDTGF (SEQ ID NO: 166) (II), где Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; n представляет собой целое число от 3 до 20, и m представляет собой целое число от 3 до 20; Xaa1 представляет собой Gly, Ala, Val, Arg, Lys, Asp или Glu; Xaa2 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr; Xaa3 представляет собой Arg, Lys, Asn, Gln, Ser, Thr; Xaa4 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr; Xaa5 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Gly или Pro; Xaa6 представляет собой Gly, Ala, Val, Asp или Glu; и Xaa7 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Arg или Lys.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность представленного в настоящей заявке полипептида AFFIMER® представлена в общей формуле (III):

MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKT  
QVLA-(Xaa)<sub>n</sub>-STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP-(Xaa)<sub>m</sub>-ADR  
VLTGYQVDKNKDELDTGF (SEQ ID NO: 167) (III),

где Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; n представляет собой целое число от 3 до 20, и m представляет собой целое число от 3 до 20.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 180) (IV), где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из D, G, N и V; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из W, Y, H и F; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из W, Y, G, W и F; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Q, A и P; aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из A, Q, E, R и S; aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из K, R и Y; aa7 представляет собой аминокислоту, выбранную из W и Q; aa8 представляет собой аминокислоту, выбранную из P и H; aa9 представляет собой аминокислоту, выбранную из H, G и Q.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-55. В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представляет собой аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-55. В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 22, 24, 26, 35, 40, 41 и 45. В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 22, 24, 26, 35, 40, 41 и 45.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>m</sub> представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 181) (IV), где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Y, F, W и N; aa2 представляет собой аминокислоту,

выбранную из К, Р, Н, А и Т; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из V, N, G, Q, A и F; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Н, Т, Y, W, K, V и R; aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из Q, S, G, P и N; aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из S, Y, E, L, K и T; aa7 представляет собой аминокислоту, выбранную из S, D, V и K; aa8 представляет собой аминокислоту, выбранную из G, L, S, P, H, D и R; aa9 представляет собой аминокислоту, выбранную из G, Q, E и A.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 57-108. В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 57-108. В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 75, 77, 79, 88, 93, 94 и 98. В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 75, 77, 79, 88, 93, 94 и 98.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 110-116 и 138. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 110-116 и 138.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_n$  представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (IV), где aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa2 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa4 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa5 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa6 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa7 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa8 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; и aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (IV), где aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa2 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой

цепью; aa4 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa5 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa6 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa7 представляет собой аминокислоту с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa8 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; и aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью выбрана из цистеина (C или Cys) и глицина (G или Gly); аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью выбрана из аланина (A или Ala), изолейцина (I или Ile), лейцина (L или Leu), метионина (M или Met), фенилаланина (F или Phe), пролина (P или Pro), триптофана (W или Trp) и валина (V или Val); аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аспарагина (N или Asn), глутамина (Q или Gln), серина (S или Ser), треонина (T или Thr) и тирозина (Y или Tyr); аминокислота с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аргинина (R или Arg), гистидина (H или His) и лизина (K или Lys); и аминокислота с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аспартата (D или Asp) и глутамата (E или Glu).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность представленного в настоящей заявке полипептида AFFIMER® представлена в общей формуле (III):

MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKT  
 QVLA-(Xaa)<sub>n</sub>-STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP-(Xaa)<sub>m</sub>-ADR  
 VLTGYQVDKKNKDELDTGF (SEQ ID NO: 167) (III),

где (Xaa)<sub>n</sub> представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 4-55 или любой из SEQ ID NO: 22, 24, 26, 35, 40, 41 и 45, и/или (Xaa)<sub>m</sub> представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 57-108 или любой из SEQ ID NO: 75, 77, 79, 88, 93, 94 и 98.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептидов включает цистеин, необязательно доступный для химической конъюгации, и при этом необязательно цистеин расположен в С-концевой области или N-концевой области полипептида.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды дополнительно включают гетерологичный полипептид, ковалентно связанный через амидную связь с образованием непрерывного слитого белка.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает терапевтический полипептид.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид выбран из

группы, состоящей из гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой антагонист гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов или токсинов.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид выбран из группы, состоящей из рецепторов-ловушек и лигандов рецепторов. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой антагонист рецепторов-ловушек или лигандов рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность терапевтического полипептида выбрана из группы, состоящей из ангиогенных агентов и анти-ангиогенных агентов. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой антагонист ангиогенных агентов или анти-ангиогенных агентов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность терапевтического полипептида представляет собой нейротрансмиттер, например, Нейропептид Y.

В некоторых вариантах осуществления последовательность терапевтического полипептида представляет собой эритропоэз-стимулирующий агент, например, эритропоэтин или миметик эритропоэтина.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой инкретин. Например, инкретин может представлять собой глюкагон, гастроингибирующий пептид (GIP), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), пептид YY (PYY) или оксинтомодулин (ОХМ).

Для дополнительной иллюстрации в некоторых вариантах осуществления терапевтические белки по настоящему изобретению включают, в дополнение к по меньшей мере одной последовательности HSA-связывающего AFFIMER®, полипептидную последовательность эритропоэтина (EPO), такую как показана в SEQ ID NO:133

SEQ ID NO: 133	APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITGCA EHCSLNENIT VPDTKVNFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS GLRSLTTLRL ALGAQEAI SP PDAASAAPLR TITADTFRKL FRVYSNFLRG KLKLYTGEAC RTGD
----------------	--

Полипептидная последовательность для иллюстративного слияния ХТ/ЕРО показана как SEQ ID NO: 134, где первая подчеркнутая последовательность представляет собой последовательность сигнала секреции, а вторая подчеркнутая последовательность представляет собой полипептидную последовательность  $(G_4S)_n$ -связанного ЕРО:

SEQ ID NO: 134	<u>MPLLLLLLPLL</u> <u>WAGALAI</u> <u>PRGLSEA</u> <u>KPATPEIQEI</u> <u>VDKVKPQLEE</u>
	<u>KTNETYGKLE</u> <u>AVQYKTQVLA</u> <u>NFFQRRWPGS</u> <u>TNYIYKVRAG</u>
	<u>DNKYMHLKVF</u> <u>NGPWKFRNTD</u> <u>RGADRVLTGY</u> <u>QVDKNKDDEL</u>
	<u>TGFAAAGGRA</u> <u>EQKLISEEDL</u> <u>GAAGGGGSGG</u> <u>GGSGGGGSGG</u>
	<u>GGSAPTSSSA</u> <u>PPRLICDSRV</u> <u>LERYLLEAKE</u> <u>AENITTGCAE</u>
	<u>HCSLNENITV</u> <u>PDTKVNFYAW</u> <u>KRMEVGQQAV</u> <u>EVWQGLALLS</u>
	<u>EAVLRGQALL</u> <u>VNSSQPWEPL</u> <u>QLHVDKAVSG</u> <u>LRSLTLLRA</u>
	<u>LGAQEAI</u> <u>SPP</u> <u>DAASA</u> <u>PLRT</u> <u>ITAD</u> <u>FRKLF</u> <u>RVYS</u> <u>NFLRGK</u>
	<u>LKLYT</u> <u>GEACR</u> <u>TGD</u>

В некоторых вариантах осуществления используют вариантную последовательность для ЕРО, в которой один или несколько аминокислотных остатков, которые могут служить сайтами для гликозилирования, заменены аминокислотным остатком, который не служит сайтом для гликозилирования. Например, один или несколько аминокислотных остатков Asn24, Asn38, Asn83 и Ser126 SEQ ID NO: 133 могут быть заменены, например, аминокислотным остатком, отличным от Asn или Ser, например, заменены на Ala. Полипептидная последовательность для иллюстративного слияния ХТ/вариантный ЕРО показана как SEQ ID NO: 135, где первая подчеркнутая последовательность представляет собой последовательность сигнала секреции, а вторая подчеркнутая последовательность представляет собой полипептидную последовательность (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>-связанного вариантного ЕРО:

SEQ ID NO: 135	<u>MPLLLLLLPLL</u> <u>WAGALAI</u> <u>PRGLSEA</u> <u>KPATPEIQEI</u> <u>VDKVKPQLEE</u>
	<u>KTNETYGKLE</u> <u>AVQYKTQVLA</u> <u>NFFQRRWPGS</u> <u>TNYIYKVRAG</u>
	<u>DNKYMHLKVF</u> <u>NGPWKFRNTD</u> <u>RGADRVLTGY</u> <u>QVDKNKDDEL</u>
	<u>TGFAAAGGRA</u> <u>EQKLISEEDL</u> <u>GAAGGGGSGG</u> <u>GGSGGGGSGG</u>
	<u>GGSAPTSSSA</u> <u>PPRLICDSRV</u> <u>LERYLLEAKE</u> <u>AEAITTGCAE</u>
	<u>HCSLNEAITV</u> <u>PDTKVNFYAW</u> <u>KRMEVGQQAV</u> <u>EVWQGLALLS</u>
	<u>EAVLRGQALL</u> <u>VASSQPWEPL</u> <u>QLHVDKAVSG</u> <u>LRSLTLLRA</u>
	<u>LGAQEAI</u> <u>SPP</u> <u>DAASA</u> <u>PLRT</u> <u>ITAD</u> <u>FRKLF</u> <u>RVYS</u> <u>NFLRGK</u>
	<u>LKLYT</u> <u>GEACR</u> <u>TGD</u>

В качестве примера слияния инкретин-ХТ, аналоги GLP-1, используемые для дулаглутида или экзендина-4, можно использовать для создания слитого белка с последовательностью HSA-связывающего AFFIMER®, такой как показана в SEQ ID NO: 136 или 137, где первая подчеркнутая последовательность представляет собой последовательность сигнала секреции, а вторая подчеркнутая последовательность представляет собой (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>-связанную последовательность, разделяющую вариантную полипептидную последовательность GLP-1 и полипептидную последовательность HSA-связывающего AFFIMER®:

SEQ ID NO: 136	MPLLLLLLPLL WAGALAHGEG TFTSDVSSYL LEEQAAKEFI AWLVKGGGGS GGGSGGGGS GGGGSIPRGL SEAKPATPEI QEIVDKVKPQ LEEKTNETYG KLEAVQYKTQ VLANFFQRRW PGSTNYYIKV RAGDNKYMHL KVFNGPWKFR NTDRGADRVL TGYQVDKNKD DELTGFAAAG GRAEQKLISE EDLGAA
SEQ ID NO: 137	MPLLLLLLPLL WAGALAHGEG TFTSDLSKQM EEEAVRLFIE WLKNGGPSSG APPPSHGECT FTSDVSSYLL EEQAAKEFIA WLVKGGGGS GGGSGGGGS GGGGSIPRGLS EAKPATPEIQ EIVDKVKPQL EEKTNETYK LEAVQYKTQV LANFFQRRWP GSTNYYIKVR AGDNKYMHLK VFNGPWKFRN TDRGADRVL TGYQVDKNKDD ELTGFAAAGG RAEQKLISEE DLGAA

В некоторых вариантах осуществления полипептиды продлевают время полужизни гетерологичного полипептида в сыворотке *in vivo*. Например, гетерологичный полипептид может иметь увеличенное время полужизни, которое по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 30 раз превышает время полужизни гетерологичного полипептида, не связанного с полипептидом AFFIMER®.

Другие аспекты настоящего изобретения обеспечивают фармацевтические препараты, например, для терапевтического применения для пациента-человека, включающие любой из полипептидов AFFIMER®, описанных в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый эксципиент (например, носитель, буфер и/или соль и т.д.).

Другие аспекты настоящего изобретения обеспечивают полинуклеотиды, включающие последовательность, кодирующую полипептиды AFFIMER®, описанные в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с последовательностью регуляции транскрипции. Последовательность регуляции транскрипции может быть, например, промотором или энхансером. В настоящей заявке рассматриваются другие последовательности регуляции транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает точку начала репликации, элемент поддержания минихромосомы (ММЕ) и/или элемент ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включают сигнальную последовательность полиаденилирования, функционально связанную и транскрибируемую с последовательностью, кодирующей полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает по меньшей мере одну интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает по меньшей мере один сайт связывания рибосомы, транскрибируемый с последовательностью, кодирующей полипептид.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Следующие аспекты настоящего изобретения обеспечивают вирусные векторы, плазмиды и/или миникольца, включающие полипептиды AFFIMER®, описанные в настоящей заявке.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения обеспечивают способы, которые включают введение субъекту с аутоиммунным заболеванием терапевтически эффективного количества полипептидов AFFIMER®, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает слитый белок, включающий любой из полипептидов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно включает линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой жесткий линкер. В некоторых вариантах осуществления жесткий линкер включает последовательность SEQ ID NO: 161. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер включает последовательность SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает два из любых полипептидов, описанных в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно включает терапевтическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая молекула представляет собой терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид выбран из гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов, или выбран из антагонистов гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов.

В некоторых вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фиг. 1** Выравнивание последовательностей связывающих петель из девяти аминокислот (петли 2 и 4) AFFIMER®, выбранных с использованием фагового дисплея. Последовательности, слева направо и сверху вниз, соответствуют SEQ ID NO: 22, 75, 45, 98, 26, 79, 48, 101, 23, 76, 40, 93, 41, 94, 24, 77, 33, 86, 36, 89, 35, 88, 38, 91, 50, 103, 56 и 109.

**Фиг. 2** Семейства последовательностей связывающих петель AFFIMER® с аналогичными мотивами из селекции фагов сывороточного альбумина. Последовательности, слева направо и сверху вниз, соответствуют SEQ ID NO: 169-178.

**Фиг. 3А и 3В** Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ (Фиг. 3А) и SDS-PAGE (Фиг. 3В) очищенных мономерных полипептидов AFFIMER®, связывающих сывороточный альбумин.

**Фиг. 4А-4D** Анализ кинетического связывания Octet очищенных полипептидов AFFIMER®, связывающих сывороточный альбумин, с различными видами сывороточного альбумина при pH 6,0 и pH 7,4. Показаны HSA-20 (Фиг. 4А), HSA-31 (Фиг. 4В), HSA-36 (Фиг. 4С) и HSA-41 (Фиг. 4D).

**Фиг. 5** Кинетический анализ BIACORE™ очищенных белков AFFIMER®, связывающих сывороточный альбумин, с различными видами сывороточного альбумина при pH 6,0 и pH 7,4.

**Фиг. 6** Анализ ELISA связывания полипептида AFFIMER® с сывороточным альбумином от разных видов при pH 7,4.

**Фиг. 7** Анализ ELISA связывания полипептида AFFIMER® с сывороточным альбумином от разных видов при pH 6,0.

**Фиг. 8** Фармакокинетический профиль пяти лидерных полипептидов AFFIMER®, связывающих сывороточный альбумин, у мышей.

**Фиг. 9А и 9В** Анализ Octet лидерных клонов AFFIMER® с расщепленной С-концевой His-меткой при pH 7,4 (Фиг. 9А) и pH 6,0 (Фиг. 9В).

**Фиг. 10** Фармакокинетический профиль связывающего сывороточный альбумин полипептида AFFIMER® с расщепленной С-концевой His-меткой у мышей.

**Фиг. 11** Уточненная сенсограмма BIACORE™, демонстрирующая, что на FcRn связывание с HSA не влияет присутствие связывающего сывороточный альбумин полипептида AFFIMER®.

**Фиг. 12А** Схематическое представление линейного слитого (in-line fusion) (ILF)) белка AFFIMER®, связывающего PD-L1/сывороточный альбумин.

**Фиг. 12В** Полученные методом эксклюзионной ВЭЖХ хроматограммы ILF белков AFFIMER®, связывающих PD-L1/сывороточный альбумин, после очистки.

**Фиг. 13** Схематическое представление тримерных ILF белков AFFIMER®, связывающих PD-L1/сывороточный альбумин.

**Фиг. 14** Получение и SDS-PAGE анализ очищенных тримерных ILF белков AFFIMER®, связывающих PD-L1/сывороточный альбумин.

**Фиг. 15** Кинетический анализ BIACORE™, показывающий, что ILF тримеры AFFIMER® сохраняют связывание как с антигеном-мишенью PD-L1, так и с сывороточным альбумином.

**Фиг. 16** График, показывающий определенное методом ELISA связывание ILF тримеров AFFIMER® с увеличенным временем полужизни с PD-L1 человека и демонстрирующий аналогичное связывание с исходной молекулой AVA04-251.

**Фиг. 17** График, показывающий, что активность ILF полипептидов AFFIMER® с увеличенным временем полужизни аналогична исходной молекуле в биологическом анализе блокады PD-1/PD-L1 (PROMEGA®).

**Фиг. 18** График, показывающий, что связывание имеющих увеличенное время полужизни ILF полипептидов AFFIMER®, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином, является эквивалентным, по данным ELISA, при pH 7,4.

**Фиг. 19** Реакция смешанных лимфоцитов (MLR), показывающая, что тримерный ILF полипептид AFFIMER® с увеличенным временем полужизни (AVA04-251 XT14) является функциональным и сохраняет активность, когда он является форматированным, по сравнению с исходной молекулой.

**Фиг. 20** Фармакокинетический профиль ILF тримеров с увеличенным временем полужизни у мышей.

**Фиг. 21А-21С** Эффективность *in vivo* ILF AVA04-251 XT14 в модели ксенотрансплантата A375. Фиг. 21А показывает отдельные линии на графике в засивимости от времени. 21В показывает результаты на Фиг. 21А, объединенные по группам. Фиг. 21С показывает объем опухоли в каждой группе.

**Фиг. 22** Экспрессия и очистка AVA04-251 XT14-cys из *E. coli*.

**Фиг. 23** Фармакокинетический профиль HSA-41 в дважды гуманизированной мышинной модели неонатального Fc-рецептора (FcRn)/альбумина.

**Фиг. 24** Фармакокинетический профиль HSA-41, HSA-18 и HSA-31 у яванского макака.

**Фиг. 25А** Получение и характеристика имеющего увеличенное время полужизни тримера AFFIMER® против мышинового PD-L1.

**Фиг. 25В** Определение  $K_D$  AVA04-182 XT20 против мышинового PD-L1 Fc с использованием BIACORE™.

**Фиг. 26А и 26В** ELISA, показывающий связывание AVA04-182 XT20 с MSA при pH 7,4 (Фиг. 26А) и 6,0 (Фиг. 26В).

**Фиг. 26С** Конкурентный анализ ELISA связывания mPD-L1 обоими AVA04-182 и AVA04-182 XT20

**Фиг. 27** Фармакокинетический профиль AVA04-182 XT20 тримера, AVA04-182 Fc форматированного полипептида AFFIMER® у мышей.

**Фиг. 28А-28С** Схематическое представление (Фиг. 28А) и характеристика AVA04-251 ВН cys ILF димерного белка. Фиг. 28В показывает анализ на чистоту, а Фиг. 28С показывает анализ SDS-PAGE.

**Фиг. 29А и 29В** Оценка связывающей способности флуоресцентно меченных AFFIMER® полипептидов AVA04-251 ВН cys800 (Фиг. 29А) и AVA04-251 XT14 cys800 (Фиг. 29В) по сравнению с исходными молекулами с использованием анализа связывания с huPD-L1 методом ELISA.

**Фиг. 30** Репрезентативные изображения биораспределения флуоресцентно меченных полипептидов AFFIMER® против huPD-L1 в двух моделях ксенотрансплантата меланомы A375 через четыре часа после обработки.

**Фиг. 31А** Изображение кристаллов, образованных из комплекса HSA и анти-HSA AFFIMER® полипептида HSA-41.

**Фиг. 31В** Рассчитанные трехмерные структуры анти-HSA полипептида AFFIMER® HSA-41 в комплексе с HSA, полученном в результате кристаллизации белкового комплекса.

**Фиг. 31С** и **31D** Аминокислотные взаимодействия между остатками петли 2 (Фиг. 31С) и петли 4 (Фиг. 31D) полипептида AFFIMER® на поверхности контакта с HSA.

**Фиг. 32А** Схематическое представление форматов ILF гомодимера HSA-41.

**Фиг. 32В** Таблица значений  $K_D$  для связывания с HSA при pH 7,4 по сравнению с мономером.

**Фиг. 32С** Сенсограммы BIACORE™, показывающие эффекты авидности на HSA мономера HSA-41, когда он генетически связан с образованием димера.

**Фиг. 33А-33С** Инкубации мономера HSA-41 с сывороточным альбумином, анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ (**Фиг. 33А**, соотношение 1:1; **Фиг. 33В**, соотношение 1:2; **Фиг. 33С**, наложение 1:1).

**Фиг. 34** Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ инкубаций линейного слитого (ILF) димера HSA-41 с сывороточным альбумином.

**Фиг. 35** Фармакокинетический анализ мономера и ILF димера HSA-41 у мышей C57BL/6.

**Фиг. 36** Кинетический анализ Вiascore сывороточного альбумина с использованием мутантов с нокаутом петли 4 HSA-41.

**Фиг. 37** Эпитоп-специфическая сортировка связывающих сывороточный альбумин лидерных полипептидов AFFIMER® против HSA-41 с использованием гомогенного флуоресцентного анализа с временным разрешением (HTRF).

**Фиг. 38А** и **38В** Исследование методом эксклюзионной ВЭЖХ и SDS-PAGE формата HSA-41 со свободным С-концевым цистеином (CQ).

**Фиг. 39** Кинетический анализ Вiascore связывания формата HSA-41 со свободным С-концевым цистеином (CQ) с HSA при pH 7,4.

**Фиг. 40** Анализ контроля качества (чистоты) AVA04-251 XT ILF с продлевающим время полужизни AFFIMER® полипептидом HSA-18 (два разных формата: XT60 и XT61).

**Фиг. 41А** и **41В** Кинетический анализ Вiascore на связывание XT60 и XT61 ILF с HSA при pH 7,4 (**Фиг. 41А**) и pH 6,0 (**Фиг. 41В**).

**Фиг. 42** Анализ ELISA на связывание XT60 и XT61 ILF с HAS и MSA при pH 7,4.

**Фиг. 43** Кинетический анализ Вiascore XT60 и XT61 ILF для связывания с MSA при pH 6,0.

**Фиг. 44** Кинетический анализ Вiascore на связывание XT60 и XT61 ILF полипептидов с PD-L1 Fc человека.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение основано на создании полипептидов AFFIMER®, которые связываются с человеческим сывороточным альбумином (HSA) для контролируемого увеличения времени полужизни в сыворотке любых других терапевтических молекул (например, терапевтического полипептида AFFIMER®, белка, нуклеиновой кислоты или лекарственного средства), с которыми они конъюгированы. Приведенные в настоящей заявке экспериментальные данные демонстрируют, что время полужизни в сыворотке полипептида AFFIMER® может быть значительно увеличено путем связывания с

альбумином *in vivo*.

Основанные на встречающихся в природе белках (цистатинах), которые были сконструированы так, чтобы стабильно экспонировать две петли, создающие связывающую поверхность, связывающие сывороточный альбумин полипептиды AFFIMER® по настоящему изобретению обеспечивают ряд преимуществ по сравнению с антителами, фрагментами антител и другими отличными от антител связывающимися белками. Одним из них является небольшой размер самого полипептида AFFIMER®. В мономерной форме он составляет около 14 кДа, или 1/10 размера антитела. Этот небольшой размер дает большой потенциал для повышенного проникновения в ткани, особенно в плохо васкуляризированные и/или фиброзные ткани-мишени (например, опухоли). Полипептиды AFFIMER® имеют простую белковую структуру (по сравнению с многодоменными антителами) и, поскольку полипептиды AFFIMER® не требуют для своего функционирования дисульфидных связей или других посттрансляционных модификаций, эти полипептиды можно получать в прокариотических и эукариотических системах.

Используя библиотеки полипептидов AFFIMER® (такие как методы фагового дисплея, описанные в прилагаемых примерах), а также сайт-направленный мутагенез, можно получить полипептиды AFFIMER® с настраиваемой кинетикой связывания с идеальными диапазонами для терапевтического применения. Например, полипептиды AFFIMER® могут обладать высокой аффинностью к HSA, такой как одноразрядное наномолярное или более низкое значение  $K_d$  для мономерных полипептидов AFFIMER®, и пикомолярные значения  $K_d$  и avidности в мультивалентных форматах. Полипептиды AFFIMER® могут быть созданы с жесткой кинетикой связывания для HSA, такой как низкие скорости  $K_{off}$  в диапазоне от  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$  (сек-1), что способствует локализации в ткани-мишени.

Связывающие сывороточный альбумин полипептиды AFFIMER® по настоящему изобретению, включают полипептиды AFFIMER® с высокой селективностью.

Более того, связывающие сывороточный альбумин полипептиды AFFIMER® легко форматируются, что позволяет с легкостью создавать и производить такие форматы, как Fc-слияния, слияния целых антител и линейные мультимеры.

Отсутствие необходимости в дисульфидных связях и посттрансляционных модификациях также делает возможным терапевтическую доставку многих вариантов белков, включая связывающие сывороточный альбумин полипептиды AFFIMER®, которые предназначены для доставки в терапевтических целях, путем экспрессии конструкций доставки генов, которые вводят в ткани пациента, включая форматы, в которых белок доставляется системно (например, экспрессия из мышечной ткани) или доставляется локально (например, посредством внутриопухолевой доставки гена).

Полипептид AFFIMER® (также называемый просто AFFIMER®) представляет собой небольшой высокостабильный полипептид (например, белок), который представляет собой рекомбинантно сконструированный вариант полипептидов стефина.

Таким образом, термин “полипептид AFFIMER®” можно использовать в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином “рекомбинантно сконструированный вариант полипептида стефина”. Полипептид стефина представляет собой подгруппу белков суперсемейства цистатинов - семейства, которое включает белки, содержащие множество цистатин-подобных последовательностей. Подгруппа стефинов семейства цистатинов представляет собой относительно небольшие (~ 100 аминокислот) однодоменные белки. Они не получают известных посттрансляционных модификаций и не имеют дисульфидных связей, что позволяет предположить, что они будут способны укладываться одинаково в широком диапазоне внеклеточных и внутриклеточных условий. Стефин А представляет собой мономерный одноцепочечный однодоменный белок из 98 аминокислот. Структура стефина А была решена, что облегчило рациональную мутацию стефина А в полипептид AFFIMER®. Единственной известной биологической активностью цистатинов является ингибирование активности катепсина, что позволило провести тщательное тестирование остаточной биологической активности сконструированных белков.

Полипептиды AFFIMER® демонстрируют две пептидные петли и N-концевую последовательность, которые можно рандомизировать для связывания с желаемыми белками-мишенями с высокой аффинностью и специфичностью, аналогично моноклональным антителам. Стабилизация двух пептидов каркасом белка стефина А ограничивает возможные конформации, которые могут принимать пептиды, повышая аффинность и специфичность связывания по сравнению с библиотеками свободных пептидов. Эти сконструированные не являющиеся антителами белки разработаны для имитации связанных с молекулярным распознаванием характеристик моноклональных антител в различных применениях. Можно осуществить вариации других частей полипептидной последовательности стефина А, при этом такие вариации улучшают свойства этих аффинных реагентов, такие как повышение стабильности, делают их устойчивыми, например, в диапазоне температур и рН. В некоторых вариантах осуществления полипептид AFFIMER® включает последовательность, полученную из стефина А, которая в значительной степени совпадает с последовательностью стефина А дикого типа, такой как человеческий стефин А. В некоторых вариантах осуществления полипептид AFFIMER® имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 25%, 35%, 45%, 55% или 60% идентичность с последовательностями, соответствующими человеческому стефину А. Например, полипептид AFFIMER® может иметь аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, например, когда вариации последовательности не оказывают неблагоприятного воздействия на способность каркаса связываться с желаемой мишенью, и, например, которые не восстанавливают и не генерируют биологические функции, такие как те, которыми обладает стефин А дикого типа, но которые исчезают при мутационных изменениях,

описанных в настоящей заявке.

### **Полипептиды AFFIMER®, связывающие человеческий сывороточный альбумин**

Один аспект настоящего изобретения обеспечивает полипептиды AFFIMER®, которые связывают человеческий сывороточный альбумин (HSA) (называемые анти-HSA полипептидами AFFIMER®). Человеческий сывороточный альбумин (HSA) представляет собой белок, кодируемый геном ALB. HSA представляет собой полипептид из 585 аминокислот (приблизительно 67 кДа), имеющий время полужизни в сыворотке около 20 дней, и является в первую очередь ответственным за поддержание коллоидно-осмотического кровяного давления, рН крови, а также за транспорт и распределение многочисленных эндогенных и экзогенных лигандов. HSA имеет три структурно гомологичных домена (домены I, II и III), почти полностью находится в альфа-спиральной конформации и в высокой степени стабилизирован 17 дисульфидными мостиками. Репрезентативная последовательность HSA предоставлена UniProtKB под первичным регистрационным номером P02768 и может включать другие человеческие изоформы.

Анти-HSA полипептиды AFFIMER® включают полипептид AFFIMER®, в котором по меньшей мере одна из петель, доступных для растворителя, происходит из белка стефина А дикого типа, имеющего аминокислотные последовательности, позволяющие полипептиду AFFIMER® селективно связывать HSA, и в некоторых вариантах осуществления с  $K_d$   $10^{-6}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$  от  $1 \times 10^{-9}$  М до  $1 \times 10^{-6}$  М при рН от 7,4 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-6}$  М или менее при рН от 7,4 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее при рН от 7,4 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  М или менее при рН от 7,4 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее при рН от 7,4 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$  от  $1 \times 10^{-9}$  М до  $1 \times 10^{-6}$  М при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-6}$  М или менее при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  М или менее при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления полипептиды связываются с HSA с  $K_d$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее при рН 7,4.

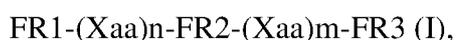
В некоторых вариантах осуществления полипептиды при рН 5,8-6,2 связываются с HSA с значением  $K_d$ , которое на половину  $\log$  - 2,5  $\log$  меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при рН 7,4-7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды при рН 5,8-6,2 связываются с HSA с значением  $K_d$ , которое по меньшей мере на половину  $\log$  меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при рН 7,4-7,6. В некоторых вариантах осуществления полипептиды при рН 5,8-6,2 связываются с HSA с значением  $K_d$ , которое по меньшей мере



пациентов-людей более 288 часов. В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 312 часов. В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 336 часов. В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 360 часов. В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей от 24 до 360 часов, от 48 до 360 часов, от 72 до 360 часов, от 96 до 360 часов или от 120 до 360 часов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 50%, более 60%, более 70% или более 80% от времени полужизни HSA в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления полипептиды имеют время полужизни в сыворотке у пациентов-людей от 50% до 80%, от 50% до 90% или от 50% до 100% от времени полужизни HSA в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® получен из человеческого белка стефина А дикого типа, имеющего каркасную последовательность и в котором одна из петли 2 (обозначенной  $(Xaa)_n$ ) и петли 4 (обозначенной  $(Xaa)_m$ ) или обе заменены альтернативными последовательностями петель  $(Xaa)_n$  и  $(Xaa)_m$ , чтобы получить общую формулу (I):



где FR1 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с MIPGGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGKLEA VQYKTQVLA (SEQ ID NO: 1); FR2 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с GTNYYIKVRA GDNKYMHLKV FKSL (SEQ ID NO: 2); FR3 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с EDLVLTGYQV DKNKDELGTG F (SEQ ID NO: 3); Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; и n представляет собой целое число от 3 до 20 и m представляет собой целое число от 3 до 20.

В некоторых вариантах осуществления FR1 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую 80%-98%, 82%-98%, 84%-98%, 86%-98%, 88%-98%, 90%-98%, 92%-98%, 94%-98% или 96%-98% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления FR1 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96% или 95% гомологию с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления FR1 представляет собой полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления FR2 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%-96%, 84%-96%, 88%-96% или 92%-96% гомологию с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR2 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 84%, 88%, 92% или 96% гомологию с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR2 представляет собой аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или даже 98% идентичность с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR2 представляет собой полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления FR3 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%-95%, 85%-95% или 90%-95% гомологию с SEQ ID No: 3. В некоторых вариантах осуществления FR3 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% гомологию с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления FR3 представляет собой полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, представленную в общей формуле (II):

MIP-Xaa1-GLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA-(Xaa)<sub>n</sub>-Xaa2-TNYIYIKVRAGDNKYMHLKVF-Xaa3-Xaa4-Xaa5-(Xaa)<sub>m</sub>-Xaa6-D-Xaa7-VLTGYQVDKNKDELDTGF (SEQ ID NO: 166) (II),

где Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; n представляет собой целое число от 3 до 20 и m представляет собой целое число от 3 до 20; Xaa1 представляет собой Gly, Ala, Val, Arg, Lys, Asp или Glu; Xaa2 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr; Xaa3 представляет собой Arg, Lys, Asn, Gln, Ser, Thr; Xaa4 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr; Xaa5 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Gly или Pro; Xaa6 представляет собой Gly, Ala, Val, Asp или Glu; и Xaa7 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Arg или Lys.

В некоторых вариантах осуществления Xaa1 представляет собой Gly, Ala, Arg или Lys. В некоторых вариантах осуществления Xaa1 представляет собой Gly или Arg. В некоторых вариантах осуществления Xaa2 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr. В некоторых вариантах осуществления Xaa2 представляет собой Gly или Ser. В некоторых вариантах осуществления Xaa3 представляет собой Arg, Lys, Asn, Gln, Ser, Thr. В некоторых вариантах осуществления Xaa3 представляет собой Arg, Lys, Asn или Gln. В некоторых вариантах осуществления Xaa3 представляет собой Lys или Asn. В некоторых вариантах осуществления Xaa4 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr. В некоторых вариантах осуществления Xaa4 представляет собой Gly или Ser. В некоторых вариантах осуществления Xaa5 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Gly или Pro. В некоторых вариантах осуществления Xaa5 представляет собой Ile, Leu или Pro. В некоторых вариантах осуществления Xaa5 представляет собой Leu или Pro. В некоторых вариантах осуществления Xaa6 представляет собой Gly, Ala, Val, Asp или Glu. В некоторых вариантах осуществления Xaa6 представляет собой Ala, Val, Asp или Glu. В некоторых вариантах осуществления Xaa6 представляет собой Ala или Glu. В некоторых вариантах осуществления Xaa7 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Arg или Lys. В некоторых вариантах осуществления Xaa7 представляет собой Ile, Leu или Arg. В некоторых вариантах осуществления Xaa7 представляет собой Leu или Arg.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER®

включает аминокислотную последовательность, представленную в общей формуле (III):

MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKT  
 QVLA-(Xaa)<sub>n</sub>-STNYIYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP-(Xaa)<sub>m</sub>-ADR  
 VLTGYQVDKNKDDDELTF (SEQ ID NO: 167) (III),

где Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; n представляет собой целое число от 3 до 20 и m представляет собой целое число от 3 до 20. В некоторых вариантах осуществления n имеет значение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления n имеет значение 8-10, 7-11, 6-12, 5-13, 4-14 или 3-15. В некоторых вариантах осуществления m имеет значение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления m имеет значение 8-10, 7-11, 6-12, 5-13, 4-14 или 3-15.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (IV),

где aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa2 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa4 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa5 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa6 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa7 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa8 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; и aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>m</sub> представлен формулой (V):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (V),

где aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa2 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; aa4 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa5 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa6 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью; aa7 представляет собой аминокислоту с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; aa8 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; и aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

Примеры аминокислот с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью включают цистеин (Cys) и глицина (Gly). В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью представляет

собой Cys. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Gly.

Примеры аминокислот с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью включают аланин (Ala), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), фенилаланин (Phe), пролин (Pro), триптофан (Trp) и валин (Val). В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Ile. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Leu. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Met. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Pro. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью представляет собой Val.

Примеры аминокислот с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью включают аспарагин (Asn), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr) и тирозин (Tyr). В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Asn. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Ser. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Thr. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Tyr.

Примеры аминокислот с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью включают аргинин (Arg), гистидин (His) и лизин (Lys). В некоторых вариантах осуществления аминокислота с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Lys.

Примеры аминокислот с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью включают аспартат (Asp) и глутамат (Glu). В некоторых вариантах осуществления аминокислота с отрицательно заряженной полярной гидрофильной

боковой цепью представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью представляет собой Glu.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_n$  представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 180) (IV),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Asp, Gly, Asn и Val; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp, Tyr, His и Phe; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp, Tyr, Gly, Trp и Phe; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Gln, Ala и Pro; aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala, Gln, Glu, Arg и Ser; aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из Lys, Arg и Tyr; aa7 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp и Gln; aa8 представляет собой аминокислоту, выбранную из Pro и His; и/или aa9 представляет собой аминокислоту, выбранную из His, Gly и Gln. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asn. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Pro. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Ser. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa7 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa7 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa8 представляет собой Pro. В некоторых вариантах осуществления aa8 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Gln.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_m$  представлен формулой (IV):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 181) (IV),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Tyr, Phe, Trp и Asn; aa2



вариантах осуществления aa8 представляет собой Pro. В некоторых вариантах осуществления aa8 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa8 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления aa8 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления aa9 представляет собой Ala.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представлен формулой (V):

Asn-aa1-aa2-Gln-Gln-Arg-Arg-Trp-Pro-Gly (SEQ ID NO: 179) (V),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp и Phe; и aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Tyr и Phe. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Phe.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представлен формулой (VI):

aa1-aa2-Trp-aa3-aa4-Lys-Trp-Pro-aa5 (VI),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Asp и Gly; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp, Tyr и Phe; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из Gln и Ala; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala и Ser; и aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из His и Gly. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Ser. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Gly.

В некоторых вариантах осуществления (Xaa)<sub>n</sub> представлен формулой (VII):

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-Trp-Pro-Gly (VII),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Gly и Asn; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Tyr, Phe, Trp и His; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp, Tyr и Phe; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala и Gln; aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala, Ser, Gln и Arg; и aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из Lys, Arg и Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asn. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Trp. В некоторых

вариантах осуществления aa2 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Ser. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa6 представляет собой Tyr.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_n$  представлен формулой (IX):

Gly-aa1-aa2-Ala-aa3-aa4-Trp-Pro-Gly (IX),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Tyr, Phe и His; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp и Tyr; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala, Ser и Arg; и aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Lys и Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Phe His. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Ser. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Tyr.

В некоторых вариантах осуществления  $(Xaa)_n$  представлен формулой (X):

aa1-aa2-aa3-Gln-aa4-aa5-Trp-Pro-aa6 (X),

где aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Asp и Asn; aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp и Phe; aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из Trp, Tyr и Phe; aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Ala, Gln и Arg; aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из Lys и Arg; и aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из His и Gly. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления aa1 представляет собой Asn. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa2 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления aa3 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Gln. В некоторых вариантах осуществления aa4 представляет собой Arg. В некоторых

вариантах осуществления aa5 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления aa5 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления aaб представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления aaб представляет собой Gly.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность петли 2, выбранную из любой из SEQ ID NO: 4-56 (Таблица 1). В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность петли 4, выбранную из любой из SEQ ID NO: 57-109 (Таблица 1).

Таблица 1

## Примеры последовательностей петель HSA AFFIMER®

Название	Петля 2	SEQ ID NO:	Петля 4	SEQ ID NO:
HSA-00	WTQPKNEHH	4	RFKYFAHYQ	57
HSA-01	HLKHTDAQP	5	FHDFWHRRW	58
HSA-02	HDQDVLHAW	6	DWYHYWWEV	59
HSA-03	KFHRQEWAD	7	STRSIHVTT	60
HSA-04	PEDFWDPEH	8	KQHNNHYLDK	61
HSA-05	VVRTTGHHVV	9	HSAQDREIP	62
HSA-06	YWWFCTGQS	10	WVQSGYNSQ	63
HSA-07	IHRQARSL	11	AVFWGKWS	64
HSA-08	SHRRRAYIW	12	QSFDPWTT	65
HSA-09	WDSHHWRAP	13	HYPLKYSFE	66
HSA-10	DKRVKYGQ	14	WHHPWHRNR	67
HSA-11	SDWVYALQL	15	DPWWAWVWV	68
HSA-12	FWWFY	16	FDNQDLIQY	69
HSA-13	VRDWPWNTF	17	EKKNWYKWD	70
HSA-14	QKKRDEDYI	18	DRHKSRWGI	71
HSA-15	GVHEEPRKL	19	LNPFTPSVT	72
HSA-16	EWQKHWPS	20	YKGALLNHD	73
HSA-17	NFFQRRWPG	21	WKFRNTERG	74
HSA-18	DWWQAKWPH	22	YKVHQSSGG	75
HSA-19	GIWQSRWPG	23	FHPIAGRPW	76
HSA-20	GYWAAKWPG	24	FPNTSYDLQ	77
HSA-21	GFYADHWPG	25	FAHYNLKSG	78
HSA-22	NWYQQRWPG	26	WHNYGESSG	79

HSA-23	GFYARHWPG	27	KFYYADHQW	80
HSA-24	DFWKAHWPG	28	YTHADPHSQ	81
HSA-25	DFYSVRWPG	29	FGVPQLGAG	82
HSA-26	YWAANHASK	30	YSGFPFAGF	83
HSA-27	IKRLEHWEY	31	WFSWPYTPL	84
HSA-28	EWDSPWSEN	32	YYHPSIQST	85
HSA-29	KHKNLRWPF	33	FLGWKDTVV	86
HSA-30	RHFPKQTNW	34	DWWKWWWAK	87
HSA-31	VWGPEYQHQ	35	NAGWPLVPE	88
HSA-32	TWKNNQDQV	36	YALDPFGGK	89
HSA-33	ATWLNYYLP	37	GYKFWGVSD	90
HSA-34	DQESLFLNN	38	QGKQYILLR	91
HSA-35	GFYAQHWPD	39	YKRHSAHDY	92
HSA-36	GHYARYWPG	40	WAQKSKVHQ	93
HSA-37	GFWASKWPG	41	FTAVSKKDA	94
HSA-38	GFWQRKWPN	42	WGDKENIWF	95
HSA-39	VVPADNDLK	43	WSGHPWVQK	96
HSA-40	HWAWTSPGY	44	YADYPLSPK	97
HSA-41	NFFQRRWPG	45	WKFRNDRG	98
HSA-42	HSHRLKGQ	46	QTVATHYHY	99
HSA-43	YQNTIFLSI	47	WHAKHLLSH	100
HSA-44	FQDQFTWSQ	48	SGIKKADSV	101
HSA-45	GEPHWPWQA	49	KANLINVKS	102
HSA-46	ADPRHPWVE	50	WKSHVEVRS	103
HSA-47	FHKRFQSQG	51	WVTQKYIIQ	104
HSA-48	EWVQNRWPN	52	WEHAKDWPT	105
HSA-49	EWYQTRWPG	53	FHSKVLDKA	106
HSA-50	EFWQRHWPG	54	YGAQKQAVW	107
HSA-51	KFYERHWPG	55	FSASHFTSQ	108
Консенсусная	GWWQRRWPG	56	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> AX <sub>3</sub> KX <sub>4</sub> DX <sub>5</sub> Q	109

В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>n</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-55. В







аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления (Хаа)<sub>m</sub> включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 110-116 и 138 (Таблица 2).

Таблица 2

## Примеры последовательностей полипептидов HSA AFFIMER®

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HSA-18	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLADWWQAKWPHSTNYYIKVRAGDNKYMHLKV FNGPYKVHSSGGADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	110
HSA-20	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLAGYWAAKWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKV FNGPFPNTSYDLQADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	111
HSA-22	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANWYQQRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKV FNGPWHNYGESSGADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	112
HSA-31	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLAVWGPEYQHQSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPNAGWPLVPEADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	113
HSA-36	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLAGHYARYWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWAOKSKVHQADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	114
HSA-37	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLAGFWASKWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPFTAVSKKDAADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	115
HSA-41	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFORRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWKFRNTDRGADRVLVTGYQVDKNKDDDELTF	116
HSA-41 CQ	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFORRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWKFRNTDRGADRVLVTGYQVDKNKDDDELTFAAAGG	138

		RAEQKLISEEDLGCAENLYFQGGGAAGHHHHH	
HSA-41 глициновых петель	x9	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPGGGGGGGGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	141
Делеция петли HSA-41	4	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	142
HSA-41 N50A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLA AFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	143
HSA-41 F51A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANAFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	144
HSA-41 F52A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFAQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	145
HSA-41 Q53A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFARRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	146
HSA-41 R54A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQARWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	147
HSA-41 R55A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRAWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	148
HSA-41 W56A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRAPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	149
HSA-41 P57A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWAGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVF NGPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	150
HSA-41 G58A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPASTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	151
HSA-41 W83A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPAKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	152
HSA-41 K84A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWAFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	153
HSA-41 F85A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKARNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	154
HSA-41 R86A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	155
HSA-41 N87A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRATDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	156
HSA-41 T88A		MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAV QYKTQVLANFFQRRWPGSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFN GPWKFRNTDRGADRVLTYGYQVDKNKDDDELDTGF	157





полужизни этой молекулы (например, терапевтического полипептида). В настоящей заявке представлен диапазон анти-HSA полипептидов AFFIMER®, с диапазоном аффинностей связывания, например, которые перекрестно реагируют с другими видами, такими как мышь и яванский макак (суно). Эти анти-HSA полипептиды AFFIMER®, в некоторых вариантах осуществления, составляют так называемую платформу AFFIMER XT™. Эти анти-HSA полипептиды AFFIMER®, как было показано в исследованиях фармакокинетики (ПК) *in vivo*, продлевают контролируемым образом время полужизни в сыворотке любого другого терапевтического агента AFFIMER®, с которым они конъюгированы в одном генетическом слиянии, например, это можно осуществить в *E. Coli*. AFFIMER XT™ также можно использовать для продления времени полужизни других пептидных или белковых терапевтических средств.

Термин время полужизни относится к количеству времени, которое требуется веществу, такому как терапевтический полипептид AFFIMER®, для потери половины своей фармакологической или физиологической активности или концентрации. На биологическое время полужизни может влиять элиминация, экскреция, деградация (например, ферментативная деградация) вещества или абсорбция и концентрация в определенных органах или тканях организма. Биологическое время полужизни можно оценить, например, путем определения времени, за которое концентрация вещества в плазме крови достигает половины ее равновесного уровня (“время полужизни в плазме”).

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® продлевает время полужизни в сыворотке молекулы (например, терапевтического полипептида) *in vivo*. Например, анти-HSA полипептид AFFIMER® может продлить время полужизни молекулы по меньшей мере в 1,2 раза по сравнению с временем полужизни молекулы, не связанной с анти-HSA полипептидом AFFIMER®. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® продлевает время полужизни молекулы по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 30 раз по сравнению с временем полужизни молекулы, не связанной с анти-HSA полипептидом AFFIMER®. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® продлевает время полужизни молекулы в 1,2-5 раз, в 1,2-10 раз, в 1,5-5 раз, в 1,5-10 раз, в 2-5 раз, в 2-10 раз, в 3-5 раз, в 3-10 раз, в 5-15 раз, в 4-10 раз или в 5-10 раз по сравнению с временем полужизни молекулы, не связанной с анти-HSA полипептидом AFFIMER®. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® продлевает время полужизни молекулы по меньшей мере на 6 часов, по меньшей мере на 12 часов, по меньшей мере на 24 часа, по меньшей мере на 48 часов, по меньшей мере на 72 часа, по меньшей мере на 96 часов, например, по меньшей мере на 1 неделю после введения *in vivo* по сравнению с временем полужизни молекулы, не связанной с анти-HSA полипептидом AFFIMER®.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® имеет увеличенное время полужизни в сыворотке и включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 117-127, 139 и 140 (Таблица 3).

Таблица 3

**Примеры последовательностей линейных слитых полипептидов AFFIMER® с увеличенным временем полужизни**

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
AVA04-236 XT7	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>KEHGPDSWW</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>QEKNOWVEE</u> ADRVLTGYQVDKNK DDELTGFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYG KLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDN KYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDKNK DDELTGF	117
AVA04-236 XT8	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>KEHGPDSWW</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>QEKNOWVEE</u> ADRVLTGYQVDKNK DDELTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEA AAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNET YGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDK NKDDELTGF	118
AVA04-261 XT9	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>HAYGPRDWD</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>PADHVLEEA</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFGFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGK LEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFG	119
AVA04-261 XT10	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>HAYGPRDWD</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>PADHVLEEA</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGD NKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDKN KDDELTGF	120
AVA04-269 XT11	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>KEYGPEEWW</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>GDYEQVLIH</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFGFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGK LEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFG	121
AVA04-269 XT12	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>KEYGPEEWW</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>GDYEQVLIH</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTFGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA	122

	AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGD NKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKN KDDELDTGF	
AVA04-251 XT14	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKD DELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDK NKDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN ETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVR AGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQV DKNKDDELDTGF	123
AVA04-251 XT15	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKD DELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGD NKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKN KDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE AAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN TYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVR AGDNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQV DKNKDDELDTGF	124
AVA04-251 XT16	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKD DELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDK NKDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN ETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVR AGDNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQV DKNKDDELDTGF	125
AVA04-251 XT14 cys	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKD DELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTYGYQVDK NKDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN ETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVR AGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQV DKNKDDELDTGFC	126

AVA04-182 XT20	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>FALPEFEY</u> MSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>PMIRRKNEV</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>FALPEFEY</u> MSTNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>PMIRRKNEV</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGF	127
SQT gly XT28	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>GGGGGGGGG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>GGGGGGGGG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>GGGGGGGGG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>GGGGGGGGG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGF	128
AVA04-251 BH	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWL</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WVPFPHOOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWL</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WVPFPHOOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGF	129
AVA04-251 BH cys	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWL</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WVPFPHOOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWL</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WVPFPHOOL</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFC	130
HSA-41 BK	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGF	131
HSA-41 DI	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTYGYQVDKNKDDELDTGFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG	132

	SMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGK LEAVQYKTQVLA <u>NFFORRWPG</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WKFRNDRG</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTGF	
AVA04-251 XT60	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTGYQVDK NKDDELTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN ETYGKLEAVQYKTQVLADWWQAKWPHSTNYYIKV RAGDNKYMHLKVFNGPYKVHQSSGGADRVLTGYQ VDKNKDDELTGF	139
AVA04-251 XT61	MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKL EAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVRAGDNK YMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTGYQVDKNKD DELTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAA AKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETY GKLEAVQYKTQVLADWWQAKWPHSTNYYIKVRAG DNKYMHLKVFNGPYKVHQSSGGADRVLTGYQVDK NKDDELTGFAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKMIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTN ETYGKLEAVQYKTQVLA <u>REGRODWVL</u> STNYYIKVR AGDNKYMHLKVFNGP <u>WVFPHQOL</u> ADRVLTGYQV DKNKDDELTGF	140

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 117-127, 139 и 140. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую по





последовательностью SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 139. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® включает аминокислотную последовательность, имеющую 80%-90% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140.

### **Полипептиды**

Полипептид представляет собой полимер, состоящий из аминокислот (встречающихся в природе или не встречающихся в природе, например, аналогов аминокислот), любой длины. Термины “полипептид” и “пептид” используются взаимозаменяемо в настоящей заявке, если не указано иное. Белок является одним из примеров полипептида. Следует понимать, что полипептид может быть линейным или разветвленным, он может включать встречающиеся в природе и/или не встречающиеся в природе (например, модифицированные) аминокислоты, и/или он может включать не являющиеся аминокислотами фрагменты (например, рассеянные по всему полимеру). Полипептид, представленный в настоящей заявке, может быть модифицирован (например, естественным или неестественным образом), например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или конъюгации с метящим компонентом. Полипептиды в некоторых случаях могут содержать по меньшей мере один аналог аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты) и/или другие модификации.

Аминокислота (также называемая аминокислотным остатком) участвует в пептидных связях полипептида. Как правило, аббревиатуры, используемые в настоящей заявке, для обозначения аминокислот, основаны на рекомендациях Комиссии IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре (см. *Biochemistry* (1972) 11:1726-1732). Например, Met, Leu, Ile, Ala и Gly представляют “остатки” метионина, изолейцина, лейцина, аланина и глицина, соответственно. Остаток представляет собой радикал, полученный из соответствующей  $\alpha$ -аминокислоты путем удаления OH части карбоксильной группы и H части  $\alpha$ -аминогруппы. Боковая цепь аминокислоты представляет собой часть аминокислоты, за исключением  $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$  части, как определено K. D. Kopple, “Peptides and Amino Acids”, W. A. Benjamin Inc., New York and Amsterdam, 1966, pages 2 и 33.

Аминокислоты, используемые в настоящей заявке, в некоторых вариантах

осуществления, представляют собой встречающиеся в природе аминокислоты, обнаруженные, например, в белках, или встречающиеся в природе анаболические или катаболические продукты таких аминокислот, которые содержат амино- и карбоксильные группы. Примеры боковых цепей аминокислот включают боковые цепи, выбранные из следующих аминокислот: глицин, аланин, валин, цистеин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, метионин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глутамин, аспарагин, лизин, аргинин, пролин, гистидин, фенилаланин, тирозин и триптофан, а также те аминокислоты и аналоги аминокислот, которые были идентифицированы как составляющие пептидглицановых стенок бактериальных клеток.

Аминокислоты, имеющие основные боковые цепи, включают Arg, Lys и His. Аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи, включают Glu и Asp. Аминокислоты, имеющие нейтральные полярные боковые цепи, включают Ser, Thr, Asn, Gln, Cys и Tyr. Аминокислоты, имеющие нейтральные неполярные боковые цепи, включают Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Pro, Trp и Phe. Аминокислоты, имеющие неполярные алифатические боковые цепи, включают Gly, Ala, Val, Ile и Leu. Аминокислоты, имеющие гидрофобные боковые цепи, включают Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr и Trp. Аминокислоты, имеющие небольшие гидрофобные боковые цепи, включают Ala и Val. Аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи, включают Tyr, Trp и Phe.

Термин “аминокислота” включает аналоги, производные и родственные соединения любой конкретной аминокислоты, указанной в настоящей заявке; например, полипептиды AFFIMER® (в частности, если они получены путем химического синтеза) могут включать аналог аминокислоты, такой как, например, цианоланин, канаванин, дженколевая кислота, норлейцин, 3-фосфосерин, гомосерин, дигидроксифенилаланин, 5-гидрокситриптофан, 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, диаминопимелиновая кислота, орнитин или диаминомасляная кислота. Другие встречающиеся в природе метаболиты или предшественники аминокислот, имеющие боковые цепи, которые подходят для данного изобретения, будут известны специалистам в данной области и включены в объем настоящего изобретения.

В настоящее изобретение также включены стереоизомеры (D) и (L) таких аминокислот, когда структура аминокислоты допускает наличие стереоизомерных форм. Конфигурация аминокислот и аминокислоты в настоящей заявке обозначены соответствующими символами (D), (L) или (DL); кроме того, когда конфигурация не указана, аминокислота или остаток могут иметь конфигурацию (D), (L) или (DL). Следует отметить, что структура некоторых соединений по настоящему изобретению включает асимметричные атомы углерода. Соответственно следует понимать, что изомеры, возникающие в результате такой асимметрии, включены в объем настоящего изобретения. Такие изомеры могут быть получены по существу в чистом виде классическими способами разделения и стерически контролируемым синтезом. Для целей настоящего раскрытия, если явным образом не указано иное, названная аминокислота должна рассматриваться как включающая как (D), так и (L) стереоизомеры.

Процентная идентичность в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми (идентичные/100% идентичность) или имеют определенный процент (например, по меньшей мере 70% идентичность) нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании (с введением гэпов, при необходимости) для максимального соответствия, без учета каких-либо консервативных аминокислотных замен как части идентичности последовательности. Процентная идентичность может быть измерена с использованием программного обеспечения или алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра. Различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для получения выравниваний аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, хорошо известны в данной области. К ним относятся, среди прочих, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, пакет GCG Wisconsin и их варианты. В некоторых вариантах осуществления две нуклеиновые кислоты или два полипептида по настоящему изобретению практически идентичны, что означает, что они имеют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренного с использованием алгоритма сравнения последовательностей или при визуальном осмотре. В некоторых вариантах осуществления идентичность существует в области аминокислотных последовательностей, которая включает по меньшей мере около 10 остатков, по меньшей мере около 20 остатков, по меньшей мере около 40-60 остатков, по меньшей мере около 60-80 остатков в длину или любое целое значение в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления идентичность существует в более длинной области, чем 60-80 остатков, например, по меньшей мере около 80-100 остатков, а в некоторых вариантах осуществления последовательности практически идентичны по всей длине сравниваемых последовательностей, например, в кодирующей области целевого белка или антитела. В некоторых вариантах осуществления идентичность существует в области нуклеотидных последовательностей, которая включает по меньшей мере около 10 оснований, по меньшей мере около 20 оснований, по меньшей мере около 40-60 оснований, по меньшей мере около 60-80 оснований в длину или любое целое значение в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления идентичность существует в области более длинной, чем 60-80 оснований, например, по меньшей мере около 80-1000 оснований или более, и в некоторых вариантах осуществления последовательности практически идентичны по всей длине сравниваемых последовательностей, например, нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок.

Консервативной аминокислотной заменой является замена одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим аналогичную

боковую цепь. В данной области техники в основном определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замена тирозина на фенилаланин является консервативной заменой. Как правило, консервативные замены в последовательностях полипептидов, растворимых белков и/или антител по настоящему изобретению не отменяют связывания полипептида, растворимого белка или антитела, содержащего аминокислотную последовательность, с целевым сайтом связывания. Способы идентификации консервативных аминокислотных замен, которые не устраняют связывание, хорошо известны в данной области.

Таким образом, должно быть понятно, что выделенная молекула (например, полипептид (например, растворимый белок, антитело и т.д.), полинуклеотид (например, вектор), клетка или другая композиция) находится в форме, не встречающейся в природе. Выделенные молекулы, например, были очищены до такой степени, которая невозможна в природе.

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула (например, полипептид (например, растворимый белок, антитело и т.д.), полинуклеотид (например, вектор), клетка или другая композиция) является по существу чистой, что относится к выделенной молекуле, которая имеет чистоту по меньшей мере 50% (например, на 50% свободна от примесей, связанных с неочищенной формой молекулы), чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95%, чистоту по меньшей мере 98% или чистоту по меньшей мере 99%.

#### **Конъюгаты, включая слитые полипептиды**

Глагол “конъюгировать” (используемый взаимозаменяемо с глаголом “связывать”) в настоящей заявке относится к соединению вместе двух или более молекул (например, полипептидов и/или химических фрагментов) с образованием другой молекулы. Таким образом, одна молекула (например, анти-HSA полипептид AFFIMER®), конъюгированная с другой молекулой (например, другим полипептидом AFFIMER®, молекулой лекарственного средства или другим терапевтическим белком или нуклеиновой кислотой), образует конъюгат. Соединение двух или более молекул может быть, например, посредством нековалентной связи или ковалентной связи. Например, анти-HSA полипептид AFFIMER®, связанный непосредственно или опосредованно с химическим фрагментом или с другим полипептидом (например, гетерологичным полипептидом), образует конъюгат, как представлено в настоящей заявке. Неограничивающие примеры конъюгатов включают химические конъюгаты (например, соединенные с использованием клик-химии или другой химической реакции) и слияния (две молекулы, связанные

смежными пептидными связями). В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой слитый полипептид, например, слитый белок. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® конъюгирован с двумя или более другими молекулами. Например, конъюгаты лекарственного средства двойного (или множественного) действия могут быть конъюгированы с анти-HSA полипептидом AFFIMER® по настоящему изобретению. Такие конъюгаты лекарственных средств двойного действия включают конъюгаты платформы TMAC (конъюгаты, активируемые микроокружением опухоли) (см., *например*, [avacta.com/therapeutics/tmac-affimer-drug-conjugates](http://avacta.com/therapeutics/tmac-affimer-drug-conjugates)).

Слитый полипептид (например, слитый белок) представляет собой полипептид, включающий по меньшей мере два домена (например, белковые домены), кодируемый полинуклеотидом, включающим нуклеотидные последовательности по меньшей мере двух отдельных молекул (например, двух генов). В некоторых вариантах осуществления полипептид включает гетерологичный полипептид, ковалентно связанный (с аминокислотой полипептида) амидной связью с образованием непрерывного слитого полипептида (например, слитого белка). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид включает терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® конъюгирован с гетерологичным полипептидом посредством смежных пептидных связей на С-конце или N-конце анти-HSA полипептида AFFIMER®.

Линкер представляет собой молекулу, встроенную между первым полипептидом (например, полипептидом AFFIMER®) и вторым полипептидом (например, другим полипептидом AFFIMER®, Fc-доменом, лиганд-связывающим доменом и т.д.). Линкером может быть любая молекула, например, один или несколько нуклеотидов, аминокислот, химических функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер (например, две или более аминокислот). Линкеры не должны отрицательно влиять на экспрессию, секрецию или биологическую активность полипептидов. В некоторых вариантах осуществления линкеры не являются антигенными и не вызывают иммунного ответа. Иммунный ответ включает ответ врожденной иммунной системы и/или адаптивной иммунной системы. Таким образом, иммунный ответ может представлять собой клеточно-опосредованный ответ и/или гуморальный иммунный ответ. Иммунный ответ может представлять собой, например, ответ Т-клеток, ответ В-клеток, ответ натуральных клеток-киллеров (NK), ответ моноцитов и/или ответ макрофагов. В настоящей заявке рассматриваются другие клеточные ответы.

В некоторых вариантах осуществления линкеры не кодируют белок.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает полипептид AFFIMER®, связанный с терапевтической или диагностической молекулой. В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает полипептид AFFIMER®, связанный с другим белком, нуклеиновой кислотой, лекарственным средством или другой малой молекулой или макромолекулой.

Любой метод конъюгации может быть использован или легко адаптирован для присоединения молекулы к полипептиду AFFIMER® по настоящему изобретению, включая, например, способы, описанные Hunter, et al., (1962) *Nature* 144:945; David, et al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; и Nygren, J., (1982) *Histochem. и Cytochem.* 30:407.

### **Терапевтические средства**

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая молекула предназначена для лечения аутоиммунного заболевания (состояния, при котором иммунная система субъекта ошибочно атакует его/ее организм). Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают тяжелую миастению, вульгарную пузырчатку, нейромиелит зрительного нерва, синдром Гийена-Барре, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (волчанку), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром (APS), аутоиммунную крапивницу, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP), псориаз, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, синдром Шегрена, гемолитическую анемию, нейтропению, паранеопластическую дегенерацию мозжечка, парапротеинемические полиневропатии, первичный билиарный цирроз, синдром ригидного человека, витилиго, тепловую идиопатическую гемолитическую анемию, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, тиреоидит Хашимото, тяжелую миастению, аутоиммунный васкулит, пернициозную анемию и глютенную болезнь. В настоящем изобретении рассматриваются другие аутоиммунные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая молекула предназначена для лечения рака. Неограничивающие примеры рака включают рак кожи (например, меланому или отличный от меланомы рак, такой как базальноклеточный или плоскоклеточный), рак легкого, рак предстательной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак почки (почечно-клеточный), рак мочевого пузыря, неходжкинскую лимфому, рак щитовидной железы, рак эндометрия, экзокринный рак и рак поджелудочной железы. В настоящем изобретении рассматриваются другие виды рака.

В некоторых вариантах осуществления полипептид AFFIMER® связан с терапевтической молекулой. При этом терапевтическая молекула может использоваться, например, для предотвращения и/или лечения заболевания у субъекта, такого как человек или другое животное. Термин лечение, как известно в данной области техники, относится к процессу облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием. Симптом может быть физическим, психическим или патологическим проявлением болезни. Известны симптомы, связанные с различными заболеваниями. Для лечения или профилактики конкретного состояния конъюгат, представленный в настоящей заявке (например, анти-HSA полипептид AFFIMER®, связанный с терапевтической молекулой), следует вводить в эффективном количестве, которое может представлять собой любое

количество, используемое для лечения или профилактики состояния. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, используемое для облегчения симптома, связанного с конкретным заболеванием, которое лечат. Известны, например, способы определения эффективных количеств различных терапевтических молекул.

Субъектом может быть любое животное (например, млекопитающее), в том числе, но не ограничиваясь этим, человек, приматы, псовые, кошачьи и грызуны. “Пациент” относится к субъекту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® связан с агонистом конкретной молекулы (например, рецептор), представляющей интерес. В других вариантах осуществления анти-HSA полипептид AFFIMER® связан с антагонистом конкретной молекулы, представляющей интерес. Агонист в настоящей заявке относится к молекуле, которая связывается с другой молекулой и активирует ее, вызывая биологический ответ. Напротив, антагонист блокирует действие агониста, а обратный агонист вызывает действие, противоположное действию агониста. Таким образом, антагонист в настоящей заявке относится к молекуле, которая связывается с другой молекулой, дезактивирует или предотвращает ее активацию.

В некоторых вариантах осуществления полипептид AFFIMER® считается “фармацевтически приемлемым”, и в некоторых вариантах осуществления его формулируют с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Молекула или другое вещество/агент считаются “фармацевтически приемлемыми”, если они утверждены или одобрены регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечислены в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для использования на животных, включая людей. Эксципиентом может быть любой инертный (неактивный), нетоксичный агент, вводимый в комбинации с полипептидом AFFIMER®. Неограничивающие примеры эксципиентов включают буферы (например, стерильный физиологический раствор), соли, носители, консерванты, наполнители и красители.

Терапевтические молекулы для использования в настоящей заявке включают, например, молекулы, признанные в официальной Фармакопее США, официальной гомеопатической фармакопее США, официальном Национальном формуляре или любом дополнении к ним, и включают, но не ограничиваются этим, низкомолекулярные химические вещества/лекарственные средства, полинуклеотиды (например, молекулы РНК-интерференции, такие как микроРНК, малая интерферирующая РНК, малая шпилечная РНК и антисмысловая РНК) и полипептиды (например, антитела). Классы терапевтических молекул, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются этим, рекомбинантные белки, антитела, цитотоксические агенты, антиметаболиты, алкилирующие агенты, антибиотики, факторы роста (например, эритропоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста кератиноцитов)), цитокины, хемокины, интерфероны (например,

интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма), факторы крови (например, фактор VIII, фактор V<sub>II</sub>A, фактор IX, тромбин, антитромбин), антимиотические агенты, токсины, апоптотические агенты (например, агенты, алкилирующие ДНК), ингибиторы топоизомеразы; агенты, вызывающие стресс эндоплазматического ретикулума; соединения платины, антиметаболиты, алкалоиды барвинка, таксаны, эптоилоны, ингибиторы ферментов, антагонисты рецепторов, ингибиторы тирозинкиназы, радиосенсибилизаторы, химиотерапевтические комбинированные терапии, рецепторы-ловушки, лиганды рецепторов, ангиогенные агенты, антиангиогенные агенты, антикоагулянты и тромболитики (например, активатор тканевого плазминогена, гирудин, белок C), нейротрансмиттеры, эритропоэз-стимулирующие агенты, гормоны роста (например, человеческий гормон роста (hGH), фолликулостимулирующий гормон), метаболитические гормоны (например, инкретины), рекомбинантные антагонисты рецептора IL-1 и биспецифические молекулы, взаимодействующие с Т-клетками (BITE<sup>®</sup>).

Конкретные примеры терапевтических молекул, с которыми может быть связан полипептид AFFIMER<sup>®</sup> против FcRn человека (например, для продления времени полужизни молекул), включают фактор роста фибробластов 21 (FGF21), инсулин, пептид рецептора инсулина, GIP (глюкозозависимый инсулинотропный полипептид), костный морфогенетический белок 9 (BMP-9), амилин, пептид YY (PYY3-36), панкреатический полипептид (PP), интерлейкин 21 (IL-21), глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), плектазин, програнулин, остеокальцин (OCN), апелин, GLP-1, эксендин 4, адипонектин, IL-1Ra (антагонист рецептора интерлейкина 1), VIP (вазоактивный кишечный пептид), PACAP (активирующий аденилатциклазу гипофиза полипептид), лептин, INGAP (белок, ассоциированный с неогенезом островков), BMP (костный морфогенетический белок) и остеокальцин (OCN).

### **Антитела**

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид, с которым связан анти-HSA полипептид AFFIMER<sup>®</sup>, представляет собой антитело (например, вариабельную область антитела). Таким образом, настоящее изобретение в некоторых вариантах осуществления обеспечивает слитый белок полипептид AFFIMER<sup>®</sup>-антитело. В некоторых вариантах осуществления слитый белок полипептид AFFIMER<sup>®</sup>-антитело включает полноразмерное антитело, включающее, например, по меньшей мере одну последовательность полипептида AFFIMER<sup>®</sup>, присоединенную к С-концу или N-концу по меньшей мере одной из его VH и/или VL цепей (по меньшей мере одна цепь собранного антитела образует слитый белок с полипептидом AFFIMER<sup>®</sup>). Слитые белки полипептид AFFIMER<sup>®</sup>-антитело в некоторых вариантах осуществления включают по меньшей мере один полипептид AFFIMER<sup>®</sup> и антигенсвязывающий сайт или вариабельную область фрагмента антитела.

Антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывает мишень, такую как полипептид (например, пептид или белок), полинуклеотид, углевод, липид или их комбинацию, через по меньшей мере один сайт

связывания антигена. Сайт связывания антигена в некоторых вариантах осуществления находится в пределах вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Антитела включают поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагменты), одноцепочечные антитела Fv (scFv) при условии, что эти фрагменты были отформатированы так, чтобы включать Fc или другой FcγRIII- связывающий домен, мультиспецифические антитела, биспецифические антитела, моноспецифические антитела, моновалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые белки, включающие антигенсвязывающий сайт антитела (отформатированные так, чтобы включать Fc или другой FcγRIII-связывающий домен), и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт связывания антигена, при условии, что антитела проявляют желаемую биологическую активность.

Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассам (изотипам) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), исходя из идентичности их константных доменов тяжелой цепи, называемых альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю.

Вариабельная область антитела может представлять собой вариабельную область легкой цепи антитела или вариабельную область тяжелой цепи антитела либо отдельно, либо в комбинации. Как правило, каждая вариабельная область тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных областей (FR) и трех областей, определяющих комплементарность (CDR), также известных как гипервариабельные области. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающих сайтов антитела. Существует как минимум два метода определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition, National Institutes of Health, Bethesda Md.) и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). Кроме того, комбинации этих двух подходов иногда используют в данной области техники для определения CDR.

Гуманизированные антитела представляют собой формы нечеловеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные не-человеческие последовательности. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки CDR-областей заменены остатками CDR не-человеческого вида (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), которые обладают желаемой специфичностью, аффинностью и/или связывающей способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками в антителе от не-человеческого вида. Гуманизированное антитело можно дополнительно модифицировать путем замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv,

либо в замененных не-человеческих остатках для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности и/или связывающей способности антитела. Гуманизированное антитело может включать переменные домены, содержащие все или практически все CDR, которые соответствуют не-человеческому иммуноглобулину, тогда как все или по существу все каркасные области представляют собой участки последовательности человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления переменные домены включают каркасные области последовательности иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления переменные домены включают каркасные области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может также включать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело обычно считается отличным от химерного антитела.

Эпитоп (также называемый антигенной детерминантой) представляет собой часть антигена, способную распознаваться и специфически связываться конкретным антителом, конкретным полипептидом AFFIMER® или другим конкретным связывающим доменом. Когда антиген представляет собой полипептид, эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, совмещенных в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот (также называемые линейными эпитопами), обычно сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой (также называемые конформационными эпитопами), обычно теряются при денатурации белка. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 и чаще по меньшей мере 5, 6, 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин “специфически связывается с” или является “специфическим для” относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и полипептидом AFFIMER®, антителом или другим партнером по связыванию, которое является определяющим в отношении присутствующей мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, полипептид AFFIMER®, который специфически связывается с мишенью, представляет собой полипептид AFFIMER®, который связывается с этой мишенью с большей аффинностью, авидностью (в случае мультимерного форматирования), более легко и/или с большей продолжительностью, чем он связывается с другими мишенями.

Неограничивающие примеры антител, которые могут быть конъюгированы с анти-HSA полипептидом AFFIMER® по настоящему изобретению, включают 3F8, 8H9, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, абрезекимаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекватумаб, адуканумаб, афазевикумаб, афелимомаб, алацизумаб пегол, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумаб мафенатокс, андекаликсимаб, анетумаб равтанзин, анифролумаб, анрукинзумаб (ИМА-638), аполизумаб, апрутумаб иксадотин, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атидортосумаб,

атинумаб, аторолимумаб, авелумаб, азинтуксизумаб ведотин, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, BCD-100, бектумомаб, бегеломаб, белантамаб мафодотин, белимумаб, бемаритузумаб, бенрализумаб, берлиматоксумаб, бермекимаб, берсанлимаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлотовсумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биртамимаб, биватузумаб мертансин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блозозумаб, бокоцизумаб, бразикумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, буросумаб, кабирализумаб, камиданлумаб тезилин, камрелизумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат сBR96-доксорубин, целелизумаб, цемиплимаб, цергутузумаб амуналейкин, цертолизумаб пегол, цетрелимаб, цетуксимаб, цибисатамаб, цирмтузумаб, цитатузумаб, богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетракетан, кодритузумаб, кофетузумаб пелидотин, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, косфровиксимаб, CR6261, кренезумаб, кризанлизумаб, кротедумаб, кузатузумаб, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб пегол, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, денозумаб, депатуксумаб мафодотин, дерлотуксимаб биотин, детумомаб, дезамизумаб, динутуксимаб, диридавумаб, домагрозумаб, дорлимомаб аритокс, достарлимаб, дрозитумаб, DS-8201, дулиготузумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, дувортуксизумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элезанумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмапалумаб, эмибетузумаб, эмицизумаб, энапотамаб ведотин, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эптинезумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этигилимаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарицимаб, фарлетузумаб, фазинумаб, FBTA05, фельвизумаб, фезакинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, флотетузумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фреманезумаб, фрезолимумаб, фровоцимаб, фруневетмаб, фулранумаб, футуксимаб, галканезумаб, галиксимаб, ганкотамаб, ганитумаб, гантенерумаб, гатипотузумаб, гавилимомаб, гедивумаб, гемтузумаб озогамин, гевокизумаб, гилветмаб, гимсилумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, госуранемаб, гуселкумаб, ианалумаб, ибализумаб, IB1308, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, ифаботузумаб, иговомаб, иладатузумаб ведотин, IMAV362, ималумаб, имапрелимаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамин, интетумумаб, иомаб-b, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, искалимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лакнотузумаб, ладиратузумаб ведотин, лампализумаб, ланаделумаб, ландогрозумаб, лапритуксимаб эмтансин, ларкавиксимаб, лебрикизумаб, лемалесомаб, лендализумаб, ленвервимаб, лензилумаб, лерделимумаб, леронлимаб,

лесофавумаб, летолизумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, лодельцизумаб, локиветмаб, лонкастуксимаб тезилин, лорвотузумаб мертансин, лосатуксимаб ведотин, лукатумумаб, лулизумаб пегол, лумиликсимаб, лумретузумаб, лупартумаб амадотин, лутикизумаб, мапатумумаб, маргетуксимаб, марстацимаб, маслимомаб, матузумаб, маврилимумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирикизумаб, мирветуксимаб соравтансин, митумомаб, модотуксимаб, могамулизумаб, монализумаб, моролимумаб, мосунетузумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, наратуксимаб эмтансин, нарнатумаб, натализумаб, навициксизумаб, навивумаб, накситамаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, NEOD001, нерелимомаб, несвакумаб, нетакимаб, нимотузумаб, нирсевимаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олеклумаб, олендализумаб, олокизумаб, омализумаб, омбуртамаб, OMS721, онартузумаб, онтуксизумаб, онватилимаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отилимаб, отлртузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, памревлумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, pdr001, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, плозализумаб, погализумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, поргавиксимаб, празинезумаб, презализумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, килизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, раневетмаб, ранибизумаб, равагалимаб, равулизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, релатлимаб, ремтолумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринукумаб, рисанкизумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пегол, рмаб, робатумумаб, роледумаб, ромилкимаб, ромосозумаб, ронтализумаб, розмантузумаб, ровалпитузумаб тезилин, ровелизумаб, розаноликсизумаб, руплизумаб, SA237, сацитузумаб говитекан, самализумаб, самротамаб ведотин, сарилумаб, сатрализумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, селикрелумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, сетрусумаб, севирумаб, SGN-CD19A, SHP647, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сиртратумаб ведотин, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, спартализумаб, стамулумаб, сулесомаб, суптавумаб, сутимлимаб, сувизумаб, сувратоксумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, талакотузумаб, тализумаб, тамтуветмаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, таволимаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, телистузумаб ведотин, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, теподитамаб, тепротумумаб, тезидолумаб, тетуломаб, тезепелумаб, TGN1412, тибулизумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тимигутузумаб, тимолумаб, тираготумаб, тислелизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, томюзотуксимаб, торализумаб, тозатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин, TRBS07,

трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, утомилумаб, вадастуксимаб талирин, ваналимаб, вандортузумаб ведотин, ванктикумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варисакумаб, варлилумаб, вателизумаб, ведолизумаб, вельтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, вонлеролизумаб, вопрателимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, вунакизумаб, ксентузумаб, ХМАВ-5574, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зенокутузумаб, зиралимумаб, золбетуксимаб (ИМАВ362, клаудиксимаб) и золимомаб аритокс.

#### **Другие терапевтические молекулы**

Неограничивающие примеры цитокинов включают IL-2, IL-12, TNF-альфа, IFN альфа, IFN бета, IFN гамма, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF бета, LT-бета, лиганд CD-40, Fas-лиганд, TGF-бета, IL-1 альфа и IL-1 бета.

Неограничивающие примеры хемокинов включают IL-8, GRO альфа, GRO бета, GRO гамма, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1 альфа/бета, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1 альфа, MIP-1 бета, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 альфа, MIP-3 бета, MCP-1-5, эотаксин, эотаксин-2, I-309, MIP-1, 6CKine, STACK, MEC, лимфотактин и фракталкин.

Неограничивающие примеры алкилирующих ДНК агентов включают азотистые иприты, такие как мехлорэтамин, циклофосфамид (ифосфамид, трофосфамид), хлорамбуцил (мелфалан, преднимустин), бендамустин, урамастин и эстрамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин (bcnu), ломустин (семустин), фотемустин, нимустин, ранимустин и стрептозоцин; алкилсульфонаты, такие как бусульфан (манносульфан, треосульфат); азиридины, такие как карбоквон, тиотепа, триазиквон, триэтиленмеламин; гидразины (прокарбазин); триазены, такие как дакарбазин и темозоломид; альтретамины и митобронитол.

Неограничивающие примеры ингибиторов топоизомеразы I включают производные кампотецина, включая СРТ-11 (иринотекан), SN-38, APC, NPC, кампотецин, топотекан, эксатекан мезилат, 9-нитрокамптотецин, 9-аминокамптотецин, луртотекан, рубитекан, силатекан, гиматекан, дифломотекан, экстатекан, BN-80927, DX-8951f и MAG-СРТ, как описано в Rommier Y. (2006) *Nat. Rev. Cancer* 6(10):789-802 и публикация патента США № 200510250854; протобербербиновые алкалоиды, и их производные, включая берберрубин и коралин, как описано в Li et al. (2000) *Biochemistry* 39(24):7107-7116 и Gatto et al. (1996) *Cancer Res.* 15(12):2795-2800; производные фенантролина, включая бензо[і]фенантридин, нитидин и фагаронин, как описано в Makhey et al. (2003) *Bioorg. Med. Chem.* 11 (8): 1809-1820; тербензимидазол и его производные, как описано в Xu (1998) *Biochemistry* 37(10):3558-3566; и производные антрациклина, включая доксорубин, даунорубин и митоксантрон, как описано в Foglesong et al. (1992) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30(2):123-125, Crow et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37(19):3191-3194 и Crespi et al. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136(2):521-8. Ингибиторы

топоизомеразы II включают, но не ограничиваются этим, этопозид и тенипозид. Двойные ингибиторы топоизомеразы I и II включают, но не ограничиваются этим, сентопин и другие нафтецендионы, DACA и другие акридин-4-карбоксамины, интоплицин и другие бензопиридоиндолы, tas-103 и другие 7h-индено[2,1-с]хинолин-7-оны, пиразолоакридин, XR 11576 и другие бензофеназины, XR 5944 и другие димерные соединения, 7-оксо-7H-дибенз[f, ij]изохинолины и 7-оксо-7H-бензо[e]перимидины и конъюгаты антраценил-аминокислота, как описано в Denny and Baguley (2003) *Curr. Top. Med. Chem.* 3(3):339-353. Некоторые агенты ингибируют топоизомеразу II и обладают активностью интеркаляции ДНК, такие как, но не ограничиваясь этим, антрациклины (акларубицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, амрубицин, пирарубицин, валрубицин, зорубицин) и антрацендионы (митоксантрон и пиксантрон).

Неограничивающие примеры агентов, вызывающих стресс эндоплазматического ретикулума, включают диметилцелекосиб (DMC), нелфинавир, целекосиб и бор-содержащие радиосенсибилизаторы (например, велкейд (бортезомиб)).

Неограничивающие примеры соединений на основе платины включают карбоплатин, цисплатин, недаплатин, оксалиплатин, тетранитрат триплатина, сатраплатин, ароплатин, лобаплатин и JM-216. (см. McKeage et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 201:1232-1237 и, в основном, CHEMOTHERAPY FOR GYNECOLOGICAL NEOPLASM, CURRENT THERAPY AND NOVEL APPROACHES, in the Series Basic and Clinical Oncology, Angioli et al. Eds., 2004).

Неограничивающие примеры антиметаболитов включают агенты на основе фолиевой кислоты, например, ингибиторы дигидрофолатредуктазы, такие как аминоптерин, метотрексат и пеметрексед; ингибиторы тимидилатсинтазы, такие как ралтитрексед, пеметрексед; на основе пурина, например, ингибитор аденозиндезаминазы, такой как пентостатин, тиопурин, такой как тиогуанин и меркаптопурин, ингибитор галогенированной/рибонуклеотидредуктазы, такой как кладрибин, клофарабин, флударабин или гуанин/гуанозин:тиопурин, такой как тиогуанин; или на основе пириимидина, например цитозин/цитидин: гипометилирующий агент, такой как азацитидин и децитабин, ингибитор ДНК-полимеразы, такой как цитарабин, ингибитор рибонуклеотидредуктазы, такой как гемцитабин, или тимин/тимидин: ингибитор тимидилатсинтазы, такой как фторурацил (5-FU). пролекарства, аналоги и производные, такие как 5'-дезоксид-5-фторуридин (доксифторидин), 1-тетрагидрофуранил-5-фторурацил (FTORAFUR®), капецитабин (XELODA®), S-I (MBMS-247616, состоящий из тегафура и двух модуляторов, 5-хлор-2,4-дигидроксипиридина и оксоната калия), ралтитрексед (TOMUDEX®), но latrexed (Thymitaq, AG337), LY231514 и ZD9331, как описано, например в Paramicheal (1999) *The Oncologist* 4:478-487.

Неограничивающими примерами алкалоидов барвинка являются винбластин, винкристин, винфлунин, виндезин и винорелбин.

Неограничивающие примеры таксанов включают доцетаксел, ларотаксел, ортатаксел, паклитаксел и тезетаксел; примером эпотилона является иабепилон.

Неограничивающие примеры ингибиторов ферментов включают ингибиторы фарнезилтрансферазы (типифамиб); ингибитор CDK (альвоцидиб, селициклиб); ингибитор протеасомы (бортезомиб); ингибитор фосфодиэстеразы (анагрелид, ролипрам); ингибитор дегидрогеназы IMP (тиазофурин); и ингибитор липоксигеназы (мазопрокол). Примеры антагонистов рецепторов включают, но не ограничиваются этим, ERA (атразентан); рецептор ретиноида X (бексаротен); и половой стероид (тестолактон).

Неограничивающие примеры ингибиторов тирозинкиназы включают ингибиторы ErbB: HER1/EGFR (эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб, вандетаниб, сунитиниб, нератиниб); HER2/neu (лапатиниб, нератиниб); RTK класса III: C-kit (акситиниб, сунитиниб, сорафениб), FLT3 (лестауртиниб), PDGFR (акситиниб, сунитиниб, сорафениб); и VEGFR (вандетаниб, семаксаниб, цедираниб, акситиниб, сорафениб); bcr-abl (иматиниб, нилотиниб, дазатиниб); Src (бозутиниб) и янус-киназы 2 (лестауртиниб).

Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают амсакрин, трабектедин, ретиноиды (алитретиноин, третиноин), триоксид мышьяка, аспарагиназу/пегаспаргазу, целекоксиб, демеклоцин, элескломол, эльсамитруцин, этоглуцид, лонидамин, лукантон, митогуазон, митотан, облимерсен, темсиролимус и вориностат.

Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических молекул, которые могут быть связаны с полипептидами AFFIMER® по настоящему изобретению, включают фломоксеф; фортимицин(ы); гентамицин(ы); глюкозосульфон соласульфон; грамицидин S; грамицидин(ы); грепафлоксацин; гуамециклин; гетациллин; изепамицин; джозамицин; канамицин(ы); фломоксеф; фортимицин(ы); гентамицин(ы); глюкозосульфон соласульфон; грамицидин S; грамицидин(ы); грепафлоксацин; гуамециклин; гетациллин; изепамицин; джозамицин; канамицин(ы); бацитрацин; бамбермицин(ы); биапенем; бродимоприм; бутирозин; капреомицин; карбенициллин; карбомицин; карумонам; цефадроксил; цефамандол; цефатризин; цефбуперазон; цефклидин; цефдинир; цефдиторен; цефепим; цефетамет; цефиксим; цефиненоксим; цефининокс; кладрибин; апалциллин; апициклин; апрамицин; арбекацин; аспоксициллин; азидамфеникол; азтреонам; цефодизим; цефоницид; цефоперазон; цефорамид; цефотаксим; цефотетан; цефотиам; цефозопран; цефпимизол; цефпирамид; цефпиром; цефпрозил; цефроксадин; цефтерам; цефтибутен; цефузонам; цефалексин; цефалоглицин; цефалоспорин C; цефрадин; хлорамфеникол; хлортетрациклин; клинафлоксацин; клиндамицин; кломоциклин; колистин; циклациллин; дапсон; демеклоциклин; диатимосульфон; дибекацин; дигидрострептомицин; 6-меркаптопурин; тиогуанин; капецитабин; доцетаксел; этопозид; гемцитабин; топотекан; винорелбин; винкристин; винбластин; тенипозид; мелфалан; метотрексат; 2-п-сульфанилианилиноэтанол; 4,4'-сульфинилдианилин; 4-сульфаниламидосалициловую кислоту; буторфанол; налбуфин; стрептозоцин; доксорубицин; даунорубицин; пликамицин; идарубицин; митомицин C; пентостатин; митоксантрон; цитарабин; флударабин фосфат; буторфанол; налбуфин; стрептозоцин; доксорубицин; даунорубицин; пликамицин; идарубицин; митомицин C;

пентостатин; митоксантрон; цитарабин; флударабин фосфат; ацедисульфон; ацетосульфон; амикацин; амфотерицин В; ампициллин; аторвастатин; эналаприл; ранитидин; ципрофлоксацин; правастатин; кларитромицин; циклоспорин; фамотидин; лейпролид; ацикловир; паклитаксел; азитромицин; ламивудин; будесонид; альбутерол; индинавир; метформин; алендронат; низатидин; зидовудин; карбоплатин; метопролол; амоксициллин; диклофенак; лизиноприл; цефтриаксон; каптоприл; салметерол; ксинафоат; имипенем; циластатин; бенazeприл; цефаклор; цефтазидим; морфин; дофамин; биаламикол; флувастатин; фенамидин; 2-этилгидразин подофиллиновой кислоты; акрифлавин; хлоразодин; арсфенамин; амикарбилд; аминоксинурид; хинаприл; оксиморфон; бупренорфин; флоксуридин; диритромицин; доксициклин; эноксацин; энвиомицин; эпициллин; эритромицин; лейкомицин(ы); линкомицин; ломефлоксацин; люценсомицин; лимециклин; меклоциклин; меропенем; метациклин; микрономицин; мидекамицин(ы); миноциклин; моксалактам; мупироцин; надифлоксацин; натамицин; неомицин; нетилмицин; норфлоксацин; олеандомицин; окситетрациклин; п-сульфанилбензиламин; панипенем; паромомицин; пазуфлоксацин; пенициллин Н; пипациклин; пипемидиновую кислоту; полимиксин; примицин; хинациллин; рибостамицин; рифамид; рифампин; рифамицин SV; рифапентин; рифаксимин; ристоцетин; ритипенем; рокитамицин; ролитетрациклин; розарамицин; рокситромицин; салазосульфадимидин; санциклин; сизомицин; спарфлоксацин; спектиномицин; спирамицин; стрептомицин; сукцисульфон; сульфакризоидин; сульфалоксовую кислоту; сульфамидохризоидин; сульфаниловую кислоту; сульфоксон; тейкопланин; темафлоксацин; темоциллин; тетроксоприм; тиамфеникол; тиазолсульфон; тиострептон; тикарциллин; тигемонам; тобрамицин; тосуфлоксацин; триметоприм; троспектомицин; тровафлоксацин; турактиномицин; ванкомицин; азасерин; кандицидин(ы); хлорфенезин; дермостатин(ы); филипин; фунгихромин; мепартицин; нистатин; олигомицин(ы); перимицин А; туберцидин; 6-азауридин; 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин; аклациномицин(ы); анцитабин; антрамицин; азацитадин; азасерин; блеомицин(ы); этилбискумацетат; этилиден дикумарол; илопрост; ламифибан; тапростен; тиокломарол; тирофибан; амиприлоза; букилламин; гусперимус; гентизиновую кислоту; глюкаметацин; гликоль салицилат; меклофенамовую кислоту; мефенамовую кислоту; месаламин; нифлумовую кислоту; олсалазин; оксацепрол; S-енозилметионин; салициловую кислоту; сальсалат; сульфасалазин; толфенамовую кислоту; карубицин; карзинофиллин А; хлорзотоцин; хромомицин(ы); деноптерин; доксифлуридин; эдатрексат; эфлорнитин; эллиптиниум; эноцитабин; эпирубицин; манномустин; меногарил; митобронитол; митолактол; мопидамог; микофеноловую кислоту; ногаламицин; оливомицин(ы); пепломицин; пирарубицин; пиритрексим; преднимустин; прокарбазин; птероптерин; пурамицин; ранимустин; стрептонигрин; тиамиприн; микофеноловую кислоту; прокодазол; ромуртид; сиролimus (рапамицин); такролимус; бутэтамин; феналкомин; гидрокситетракаин; непаин; ортокаин; пиридокаин; салициловый спирт; 3-амино-4-гидроксимасляную кислоту; ацеклофенак; альминопрофен; амфенак; бромфенак; бромсалигенин; бумадизон;

карпрофен; диклофенак; дифлунизал; дитазол; энфенамовую кислоту; этодолак; этофенамат; фендосал; фепрадинол; флуфенамовую кислоту; Томудекс (N-[[5-[[[(1,4-дигидро-2-метил-4-оксо-6-хиназолинил)метил]метиламино]-2-тиенил]карбонил]-L-глутаминовая кислота), триметрексат, туберцидин, убенимекс, виндезин, зорубицин; аргатробан; куметарол и дикумарол.

Неограничивающие примеры цитотоксических факторов включают дифтерийный токсин, А-цепь экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*, А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки и соединения *Aleurites fordii* (например, жирные кислоты), диантиновые белки, белки *Phytoiassa americana* PAPI, PAPII и PAP-S, ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *saponaria officinalis*, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин.

Неограничивающие примеры нейротрансмиттеров включают аргинин, аспартат, глутамат, гамма-аминомасляную кислоту, глицин, D-серин, ацетилхолин, дофамин, норэпинефрин (норадреналин), эпинефрин (адреналин), серотонин (5-гидрокситриптамин), гистамин, фенетиламин, N-метилфенетиламин, тирамин, октопамин, синефрин, триптамин, N-метилтриптамин, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, 2-арахидонилглицерилэфир, N-арахидоноилдопамин, виродамин, аденозин, аденозинтрифосфат, брадикинин, кортикотропин-рилизинг гормон, урокортин, галанин, галаниноподобный пептид, гастрин, холецистокинин, адренкортикотропный гормон, проопиомеланокортин, меланоцитостимулирующие гормоны, вазопрессин, окситоцин, Нейрофизин I, Нейрофизин II, Нейромедин U, Нейропептид B, Нейропептид S, Нейропептид Y, Панкреатический полипептид, пептид YY, энкефалин, диноρφин, эндорфин, эндоморфин, ноцицептин/орфанин FQ, орексин A, орексин B, кисспептин, нейропептид FF, пролактин-высвобождающий пептид, пироглутамилированный рфамидный пептид, секретин, мотилин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1, глюкагоноподобный пептид-2, вазоактивный интестинальный пептид; гормон, высвобождающий гормон роста; активирующий аденилатциклазу гипофиза пептид, соматостатин, Нейрокинин A, Нейрокинин B, Вещество P, Нейропептид K, агутиродственный пептид, N-ацетиласпартилглутамат, кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт, бомбезин, гастрин-высвобождающий пептид, гонадотропин-рилизинг-гормон, меланин-концентрирующий гормон, оксид азота, оксид углерода и сернистый водород.

Неограничивающие примеры метаболитических гормонов, таких как инкретины (которые стимулируют снижение уровня глюкозы в крови), включают глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и гастроингибирующий пептид (GIP) и их аналоги, такие как дулаглутид (TRULICITY<sup>®</sup>), эксенатид (BYETTA<sup>®</sup>), лираглутид (VICTOZA<sup>®</sup>) и эксенатид с пролонгированным высвобождением (BYDUREON<sup>®</sup>).

### **Полинуклеотиды**

Полинуклеотид (также называемый нуклеиновой кислотой) представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, любой длины и может включать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или

основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, такой как анти-HSA полипептид AFFIMER®. Как известно в данной области техники, порядок дезоксирибонуклеотидов в полинуклеотиде определяет порядок аминокислот в кодируемом полипептиде (например, белке).

Полинуклеотидная последовательность может представлять собой любую последовательность дезоксирибонуклеотидов и/или рибонуклеотидов, может быть одноцепочечной, двухцепочечной или частично двухцепочечной. Длина полинуклеотида может варьироваться и не ограничена. Таким образом, полинуклеотид может содержать, например, от 2 до 1000000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет длину от 100 до 100000, длину от 100 до 10000, длину от 100 до 1000, длину от 100 до 500, длину от 200 до 100000, длину от 200 до 10000, длину от 200 до 1000 или длину от 200 до 500 нуклеотидов.

Вектор в контексте настоящей заявки относится к носителю для доставки молекулы в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии, включающий промотор (например, индуцибельный или конститутивный), функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Неограничивающие примеры векторов включают вирусные векторы (например, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и ретровирусные векторы), векторы экспрессии «голой» ДНК или РНК, плазмиды, космиды, фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК и/или РНК, связанные с катионными агентами конденсации, и векторы экспрессии ДНК и/или РНК, инкапсулированные в липосомы. Векторы могут быть трансфицированы в клетку, например, с использованием любого метода трансфекции, включая, например, совместное осаждение фосфата кальция и ДНК, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, полибрен-опосредованную трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, слияние с липосомами, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию или биолистическую технологию (биолистику).

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Выбор AFFIMER® связывающего человеческого сывороточного альбумина (HSA) и мышинового сывороточного альбумина (MSA)**

Селекцию фага, связывающего HSA или MSA, из библиотеки AFFIMER® осуществляли с использованием приблизительно  $1 \times 10^{12}$  фагов, которые были добавлены из библиотеки разнообразия размером приблизительно  $6 \times 10^{10}$ .

HSA-связывающие пептиды по изобретению были идентифицированы путем отбора из библиотеки фагового дисплея, включающей случайные последовательности петель длиной девять аминокислот, представленные в постоянном каркасном остове AFFIMER® на основе последовательности для SQT. Суспензии фага инкубировали с антигеном-мишенью (либо биотинилированным антигеном, захваченным на стрептавидиновых шариках, либо небитинилированным антигеном, захваченным на планшете). Несвязанный фаг вымывали, а затем связанный фаг элюировали путем

инкубации антигена при низком рН, затем при высоком рН. Затем *E. coli* инфицировали выделенным рН-нейтрализованным фагом и получали препарат фага первого раунда. Цикл повторяли два-три раза. Для обогащения целевым фагом условия жесткости в последующих раундах селекции еще больше ужесточались. Условия повышенной жесткости включали увеличение количества стадий промывки, снижение концентрации антигена и/или предварительный отбор с использованием блокированных стрептавидиновых шариков или лунок, покрытых блокирующим реагентом.

Антигены, используемые в настоящем изобретении для селекции фагов, представляли собой HSA (Sigma; A3782) и MSA (Alpha Diagnostics; ALB13-N-25). Биотинилирование антигена осуществляли собственными силами с использованием набора EZ Link Sulfo-NHS-LC Biotin (Pierce).

После селекции с использованием последовательных раундов амплификации фагов клоны, связывающие HSA и MSA, идентифицировали при помощи фагового ELISA, как описано ниже. После селекции фагов отдельные бактериальные клоны, содержащие фagemидный вектор, переносили из планшетов для титрования в 96-луночный формат для клеточных культур. Рекомбинантные фаговые частицы, которые демонстрировали полипептид HSA AFFIMER®, слитый с минорным белком оболочки, кодируемым геном-III, высвобождались в супернатант культуры после спасения хелперным фагом и выращивания в течение ночи. Фаг, содержащийся в супернатантах, затем подвергали скринингу на связывание с антигеном с использованием метода ELISA. Выявляемый методом фагового дисплея AFFIMER®, связывающийся с антигеном, иммобилизованным на планшете, определяли при помощи HRP-конъюгированного анти-M13 моноклонального антитела (GE Healthcare), и ELISA выполняли с использованием субстрата 1-step Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific).

Осуществляли выравнивание петли 2 и петли 4 полипептида AFFIMER®, идентифицированных из селекций фагов (**Фиг. 1**). В результате выравнивания были идентифицированы семейства мотивов последовательностей из селекций фагов HSA и MSA (**Фиг. 2**).

### **Пример 2. Продукция белка, включающего полипептид AFFIMER®, в *E. coli***

Все полипептиды AFFIMER®, экспрессированные в *E. coli*, клонировали с C-концевой гекса-HIS-меткой (НННННН; SEQ ID NO: 168) для упрощения очистки белка при помощи смолы для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (смола IMAC). При необходимости между полипептидом AFFIMER® и HIS-меткой могут быть добавлены дополнительные пептидные последовательности, такие как MYC (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 162), для детекции или сайт расщепления протеазой TEV (ENLYFQ(G/S); SEQ ID NO: 163), чтобы можно было удалить метки. Белки AFFIMER® экспрессировали из *E. coli* и очищали аффинной хроматографией на иммобилизованных ионах металла, методом ионообмена и эксклюзионной хроматографией. Очистку мономера AFFIMER® из *E. coli* выполняли путем введения экспрессионной плазмиды pD861 (Atum) в клетки BL21 *E. coli* (Millipore) с использованием протокола изготовителя.

Всю смесь трансформированных клеток высевали на чашки с агаром LB, содержащим 50 мкг/мл канамицина (AppliChem), и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день “газон” трансформированных *E. coli* переносили в стерильную колбу с 1х бульонной средой terrific (Melford) и 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 30°C при встряхивании при 250 об/мин. Экспрессию индуцировали 10 мМ рамнозы (Alfa Aesar), как только клетки достигали оптической плотности OD<sub>600</sub> приблизительно 0,8-1,0. Затем культуру инкубировали еще 5 часов при 37°C. Клетки собирали путем центрифугирования и лизиса полученного клеточного осадка. Очистку полипептида AFFIMER® выполняли с использованием аффинной очистки связанных партий His-меченного белка. В частности, использовали никель-агарозную аффинную смолу (Super-NiNTA500; Generon). Смолу промывали буфером NPI20 (50 мМ фосфата натрия, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазола) и связанный белок элюировали 5 колоночными объемами (CV) буфера NPI400. Затем элюированный белок очищали путем катионного обмена с использованием ионообменной колонки CM FF (GE) в подвижном буфере, 20 мМ ацетата натрия, pH 5,2, для клона HSA-31 (SEQ ID NO: 113) и 25 мМ MES, pH 6,0, для клона HSA-41 (SEQ ID NO: 116). Обе очистки белка дополнительно включали стадию промывки 0,1% раствором Triton 114x (Sigma), и белок элюировали с линейным градиентом 1М NaCl. Третью стадию очистки осуществляли препаративной эксклюзионной хроматографией с использованием HiLoad 26/600 Superdex 75 мкг (GE Healthcare) в буфере PBS 1x. Экспрессию и чистоту клона HSA-41 (SEQ ID NO: 116) и HSA-31 (SEQ ID NO: 113) анализировали с использованием эксклюзионной ВЭЖХ (Фиг. 3А) на колонке Acclaim SEC-300 (Thermo) с использованием подвижной фазы PBS 1x. Выход белка оценивали с использованием показаний Nanodrop (Thermo) A280, а конечный продукт анализировали на SDS-PAGE Bolt Bis Tris plus 4-12% геле (Thermo) в подвижном буфере Novex™ 20X Bolt™ MES SDS (Thermo) при 200 вольт, при нагревании образцов в восстановительном буфере. Белковые полосы на геле окрашивали Quick Commassie (Generon). Предварительно окрашенный маркер молекулярной массы белка PageRuler (Thermo) наносили на гель для оценки молекулярной массы слитых белков (Фиг. 3В) после трехэтапной очистки.

### **Пример 3. Характеристика полипептида AFFIMER®, связывающего сывороточный альбумин**

Аффинности связывания очищенных HSA-20 (SEQ ID NO: 111), HSA-31 (SEQ ID NO: 113), HSA-36 (SEQ ID NO: 114), HSA-41 (SEQ ID NO: 116) AFFIMER® белков с сыворотками человека, мыши и яванского макака оценивали методом биослойной интерферометрии (Octet) как при pH 6,0, так и при pH 7,4. Аффинности связывания HSA варьировались от 7,1 нМ до 135,5 нМ при pH 6,0, аффинности MSA варьировались от 3,7 нМ до 833,7 нМ при pH 6,0 и аффинности CSA варьировались от 18,5 нМ до 1,15 мкМ при pH 6,0 (данные представлены на Фиг. 4А-4Д, Таблица 4). Биотинилированный антиген захватывали на SA сенсорах в концентрации 1 мкг/мл в течение 600 секунд в буфере, содержащем PBS-T (0,01% Tween 20) + 1% казеина, при pH 6,0 или 7,4. Ассоциацию осуществляли в течение 300 секунд, а диссоциацию в течение 600 секунд, и регенерацию

осуществляли с использованием 10 мМ глицина pH 1,5 (GE Healthcare) в течение  $3 \times 5$  секунд. Все стадии осуществляли при 1000 об/мин и 25°C. Очищенный полипептид AFFIMER® в двукратных серийных разведениях анализировали при исходной концентрации, приблизительно равной 10-кратному значению  $K_D$ . Кинетический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения для анализа данных Octet, вычитая эталонный сенсор (нагруженный антигеном), выравнивая ось Y по исходному уровню и используя межэтапную коррекцию для выравнивания ассоциации с диссоциацией. Применяли фильтрацию Савицкого-Голея и данные обрабатывали. Анализ данных осуществляли с использованием модели 1:1, глобальной подгонки, не связанного сенсором  $R_{max}$ .

Таблица 4

**Значения  $K_D$  для белков AFFIMER®, связывающихся с сывороточным альбумином человека, мыши и яванского макака при pH 6,0 и 7,4**

Клон	MSA $K_D$ нМ		CSA $K_D$ нМ		HSA $K_D$ нМ	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
HSA-18 (SEQ ID NO: 110)	618,2	981,1	68,7	106,5	17,9	36,1
HSA-20 (SEQ ID NO: 111)	511,4	622,3	133	212,6	23,4	40,5
HSA-31 (SEQ ID NO: 113)	3,7	3,3	18,5	83	21,1	15,3
HSA-36 (SEQ ID NO: 114)	435	243,6	1140	2600	132,2	135,8
HSA-41 (SEQ ID NO: 116)	95,2	47,9	105,3	71,5	7,1	5,2
HSA-22 (SEQ ID NO: 112)	334	-	146	347,9	44,7	152,3
HSA-37 (SEQ ID NO: 115)	833,7	-	231,3	221,4	135,5	113,1

Аффинности к сыворотке мыши, человека и яванского макака также измеряли при pH 7,4 для четырех (4) AFFIMER® связующих с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Фиг. 5, Таблица 5). Кинетический анализ Biacore T200 выполняли с использованием подвижного буфера HBS-EP+ (GE Healthcare) и сенсорного чипа CM5 серии S (GE Healthcare) с иммобилизацией на поверхности Fc2, Fc3 и Fc4 с HSA (Sigma; A37812), MSA (Sigma; A3559) или сывороточным альбумином яванского макака (CSA) (Abcam; Ab184894), соответственно, в 10 мМ ацетата натрия, pH 5,0 (GE Healthcare), с использованием реагентов для аминного связывания (GE Healthcare). Осуществляли титрование концентраций мономеров AFFIMER® в качестве аналита при

скорости потока 30 мкл/мин или 60 мкл/мин. Из кинетических данных Fc2-1, Fc3-1 и Fc4-1 вычитали значения холостой пробы и подгоняли к 1:1 модели связывания Ленгмюра (программное обеспечение VIAcore Evaluation; GE) для расчета значений  $K_D$ .

Таблица 5

**Кинетика связывания с сывороточным альбумином человека, мыши и яванского макака четырех связующих AFFIMER®, измеренная при помощи Biacore SPR при pH 7,4**

Связующее AFFIMER®	Лиганд	ka [1/Мс]	kd [1/с]	$K_D$ [M]	Chi <sup>2</sup>
HSA-18 (SEQ ID NO: 110)	HSA	5,41E+04	7,89E-03	1,46E-07	0,0771
	MSA	3,41E+04	7,42E-02	2,18E-06	0,0966
	CSA	4,83E+04	2,61E-02	5,42E-07	0,148
HSA-41 (SEQ ID NO: 116)	HSA	1,43E+06	3,70E-03	2,59E-09	0,0655
	MSA	2,04E+06	1,39E-01	6,78E-08	0,236
	CSA	4,88E+05	5,46E-02	1,12E-07	0,236
HSA-20 (SEQ ID NO: 111)	HSA	5,22E+04	1,83E-02	3,50E-07	0,0503
	MSA	1,15E+05	9,81E-02	8,55E-07	0,344
	CSA	4,76E+04	1,99E-02	4,19E-07	0,372
HSA-36 (SEQ ID NO: 114)	HSA	2,25E+04	4,51E-03	2,00E-07	0,0912
	MSA	7,26E+05	1,50E-01	2,07E-07	0,481
	CSA	1,06E+05	1,60E-01	1,51E-06	0,289

**Пример 4. Перекрестная реактивность AFFIMER® с видами сывороточного альбумина**

Пять (5) белков AFFIMER® с наивысшей аффинностью к HSA анализировали на перекрестную реактивность с сывороточным альбумином человека, яванского макака, лошади, собаки, мыши, кролика, свиньи и крысы в анализе связывания ELISA как при pH 6,0, так и при pH 7,4 (Фиг. 7А-7В, Таблица 6). Вкратце, ELISA осуществляли следующим образом:

Сывороточный альбумин человека (Sigma-Aldrich); яванского макака и мыши (Abcam); лошади (Abcam); собаки (Abcam); мыши (Sigma-Aldrich); кролика (Sigma-Aldrich); свиньи (Sigma-Aldrich); и крысы (Sigma-Aldrich) наносили в течение ночи на 96-луночные планшеты (Corning Costar) в концентрации 1 мкг/мл в PBS при соответствующем pH (pH 6,0 или 7,4). Планшеты насыщали 5% казеиновым (Sigma-Aldrich) буфером в PBS. После блокирования в планшеты добавляли разведение пяти (5) лидерных связующих (HSA-18 (SEQ ID NO:110), HSA-20 (SEQ ID NO:111), HSA-36 (SEQ ID NO:114), HSA-31 (SEQ ID NO:113) и HSA-41 (SEQ ID NO:116)) и инкубировали в течение 90 минут. Затем планшеты промывали и определяли белки AFFIMER® с использованием биотинилированного поликлонального антитела против цистатина (R&D System) в течение 90 минут. После промывки добавляли стрептавидин-HRP (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 30 минут. После конечной промывки для проявления в реакцию добавляли ТМВ (Thermo Fisher Scientific) и планшеты считывали на планшет-ридере при 450 нм (Фиг. 6).

Таблица 6

**Перекрестная реактивность для связывания видов сывороточного альбумина при рН 7,4 - EC<sub>50</sub> (нМ)**

Виды	HSA-18	HSA-20	HSA-31	HSA-36	HSA-41
Человек	1,41	18,90	0,47	687,3	0,05
Яванский макак	7,14	9,55	0,43	447,1	12,85
Мышь	NA	NA	0,03	NA	42,5
Кролик	847,1	NA	210,9	863,0	380,9
Лошадь	NA	NA	0,25	661,8	150,1
Собака	96,47	NA	3,17	383,4	21,49
Свинья	615,0	893,8	2,60	267,5	51,71
Крыса	89,43	16,10	0,39	9,73	4,18

**Пример 5. Фармакокинетический профиль пяти лидеров, связывающих сывороточный альбумин, у мышей**

Пять (5) белков AFFIMER®, HSA-18 (SEQ ID NO: 110), HSA-20 (SEQ ID NO: 111), HSA-31 (SEQ ID NO: 113), HSA-36 (SEQ ID NO: 114), HSA-41 (SEQ ID NO: 116), с диапазоном различных аффинностей и констант ассоциации и диссоциации для MSA были выбраны для испытания *in vivo*. Белки AFFIMER® метили радиоактивным изотопом с использованием I-125 и вводили в дозе 10 мг/кг в виде болюсной внутривенной инъекции трем (3) мышам в каждый момент времени. Концентрацию белков AFFIMER® в сыворотке определяли для восьми (8) временных точек (в промежутке 0,25-168 часов) в течение семи (7) дней путем измерения радиоактивности (Фиг. 8, Таблица 7). Все белки AFFIMER® имели увеличенное время полужизни по сравнению с SQT gly His контрольным мономерным белком AFFIMER®, и все клоны имели хорошую переносимость *in vivo*.

**Таблица 7  
Фармакокинетические параметры белков AFFIMER® у мышей: (время полужизни, t<sub>1/2</sub>) и экспозиция (AUC 0-t) в некомпартментном анализе**

Клон	T <sub>1/2</sub> (часы)	AUC 0-t (час*мг/мл)
HSA-41	38,2	5670
HSA-36	37,7	3435
HSA-20	30,6	1401
HSA-18	24,3	1059
HSA-31	29,0	112
SQT-Gly His (контроль)	1,6	18,1

**Пример 6. Фармакокинетический профиль полипептидов AFFIMER® с отщепленной С-концевой His-меткой и с увеличенным временем полужизни у мышей**

Чтобы убедиться, что присутствие С-концевой 6x His-метки не влияет на фармакокинетический профиль полипептидов AFFIMER® *in vivo*, между белком и меткой для очистки встраивали расщепляемый линкер TEV. Отщепление С-концевой 6x His-метки лидерного клона HSA-41 (SEQ ID NO: 116) стало возможным благодаря включению сайта расщепления TEV, аминокислотной последовательности ENLYFQG (SEQ ID NO: 164), после С-концевой генной вставки полипептид AFFIMER®-Myc. Полипептиды AFFIMER® инкубировали с AcTEV в течение 1 часа при 30°C в

соответствии с рекомендациями изготовителя (Invitrogen) и удаляли отщепленную His-метку путем связывания со смолой NiNTA (Generon) и собирали поток расщепленного белка. Анти-His (R&D Systems) вестерн-блоттинг выполняли для подтверждения того, что His-метка больше не может быть обнаружена. Кинетику связывания полипептидов AFFIMER® измеряли с использованием Octet, как описано в **Примере 3**, и было показано, что полипептиды AFFIMER® сохраняют свойства связывания с HSA и MSA при pH 7,4 после отщепления C-концевой 6x His-метки (**Фиг. 9**). Оценивали фармакокинетический профиль вводимого внутривенно белка AFFIMER® с отщепленной His-меткой по сравнению с белком AFFIMER® с C-концевой His-меткой. Восемь (8) временных точек были проанализированы с использованием анти-цистатин сэндвич-ELISA в объединенной сыворотке от трех (3) мышей в каждой временной точке, результаты показывают, что белки имеют аналогичную пролонгированную фармакокинетику в присутствии C-концевой His-метки и без нее (**Фиг. 10**).

**Пример 7. Связывание FcRn с HSA в присутствии связывающего сывороточный альбумин полипептида AFFIMER®**

Пример связывания HSA с рекомбинантным FcRn не изменялся, когда 500 нМ полипептида AFFIMER® предварительно инкубировали с HSA при pH 6,0 (**Фиг. 11**). Вiascore анализ связывания FcRn выполняли с использованием чипа Biotin CAPture в соответствии с протоколом изготовителя (GE Healthcare). Вкратце, реагент Biotin CAPture пропускали в течение 300 секунд при скорости потока 2 мкл/мин по поверхности Fc1 и Fc2 с последующим захватом биотинилированного FcRn (Amsbio) при 10 мкг/мл с временем контакта 50 секунд, пропускали при 10 мкл/мин, доставляя только к Fc2. HSA с постоянной концентрацией 2,5 мкМ пропускали по поверхности Fc1 и Fc2 с предварительным смешиванием и без смешивания с HSA-20 (SEQ ID NO: 111) при 500 нМ в PBS-T pH 6,0. Не было замечено различий в связывании HSA с FcRn, когда полипептид AFFIMER® был связан с HSA, по сравнению с только альбумином. Регенерацию поверхностей Fc1 и Fc2 выполняли в соответствии с протоколом изготовителя.

**Пример 8. Связывающие PD-L1 линейные слитые (ILF) димеры AFFIMER® с увеличенным временем полужизни**

Время полужизни трех (3) PD-L1-связывающих полипептидов AFFIMER®, AVA04-236 (SEQ ID NO: 117 и 118), AVA04-261 (SEQ ID NO: 119 и 120) и AVA04-269 (SEQ ID NO: 121 и 122), было продлено путем генетического слияния с HSA-41 (SEQ ID NO: 116) на N- или C-конце. Схематическое представление PD-L1 AFFIMER® полипептидов с увеличенным временем полужизни, сформатированных в виде димерных генетических слияний с использованием жестких A(EAAAK)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 161) или гибких (G4S)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 165) повторяющихся генетических линкеров приведено на **Фиг. 12А**, и таблица ориентации и номенклатуры ILF показана в **Таблице 8**. Получение ILF димера из *E. coli* осуществляли, как описано в **Примере 3**. Вкратце, белок очищали с использованием трех стадий: аффинного захвата, ионообмена (IEX) и препаративной

экслюзионной хроматографии. Чистоту полученного ILF белка оценивали при помощи экслюзионной ВЭЖХ, и было показано, что чистота составляет >95% (Фиг. 12В). Кинетический анализ Biacore показал, что оба генетически слитых полипептида AFFIMER® были способны взаимодействовать с антигенами-мишенями, человеческим PD-L1-Fc (R&D Systems) и HSA (Sigma) (Таблица 9). Biacore выполняли, как описано в **Примере 3**, для анализа связывания HSA. Для анализа кинетики связывания PD-L1-Fc осуществляли кинетический анализ Biacore T200 с использованием подвижного буфера HBS-EP+ и сенсорного чипа CM5 серии S (GE Healthcare) с иммобилизованным Fc2c с PD-L1-Fc (R&D Systems) в 10 мМ ацетате натрия pH 4,0 с использованием реагентов для аминного связывания (GE Healthcare). Осуществляли титрование концентраций ILF полипептидов AFFIMER® в качестве аналита при скорости потока 30 мкл/мин. Регенерированный PD-L1-Fc был иммобилизован на поверхности с 3 мМ NaOH (GE Healthcare) в течение 20 секунд при скорости потока 20 мкл/мин. Из данных Fc2-1 вычитали значение холостой пробы и подгоняли к 1:1 модели связывания Ленгмюра (программное обеспечение для оценки Biacore; GE) для расчета значения кажущейся  $K_D$ .

**Таблица 8**  
**Номенклатура связывающих PD-L1 (AVA04) ILF белков AFFIMER®, время полужизни которых увеличено посредством HSA-связывающих белков AFFIMER®**

Формат AFFIMER®	AVA04 AFFIMER®	Линкер	Линкер SEQ ID NO:	AFFIMER® XT	SEQ ID NO.
AVA04-236 XT7	AVA04-236	(G4S) <sub>6</sub>	165	HSA-41	117
AVA04-236 XT8	AVA04-236	A(EAAAK) <sub>6</sub>	161	HSA-41	118
AVA04-261 XT9	AVA04-261	(G4S) <sub>6</sub>	165	HSA-41	119
AVA04-261 XT10	AVA04-261	A(EAAAK) <sub>6</sub>	161	HSA-41	120
AVA04-269 XT11	AVA04-269	(G4S) <sub>6</sub>	165	HSA-41	121
AVA04-269 XT12	AVA04-269	A(EAAAK) <sub>6</sub>	161	HSA-41	122

**Таблица 9**

**Кинетический анализ BIACORE™ белков AFFIMER®**

Белок	Линкер димера	Кинетика HuSA			Кинетика PD-L1		
		ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)
HSA-41		1,48E+06	3,54E-03	2,4			
AVA04-236					1,80E+06	9,77E-03	5,43

AVA04-236 XT7	Гибкий	2,53E+05	3,36E-03	13,3	1,57E+06	7,63E-03	4,86
AVA04-236 XT8	жесткий	2,67E+05	2,52E-03	9,5	1,52E+06	6,95E-03	4,57
AVA04-261					3,68E+06	1,09E-02	2,95
AVA04-261 XT9	Гибкий	2,69E+05	3,57E-03	13,3	3,95E+05	7,07E-03	17,9
AVA04-261 XT10	жесткий	2,99E+05	2,91E-03	9,7	8,75E+05	8,26E-03	9,44
AVA04-269					2,05E+06	3,45E-03	1,68
AVA04-269 XT11	Гибкий	1,51E+05	2,34E-03	15,5	7,96E+05	3,54E-03	4,45
AVA04-269 XT12	жесткий	1,77E+05	2,28E-03	12,9	1,14E+06	4,31E-03	3,8

**Пример 9. PD-L1-связывающие димеры AFFIMER® и линейные слитые тримеры с увеличенным временем полужизни**

На Фиг. 13 схематически представлен PD-L1-связывающий димер AFFIMER® (два мономера **SEQ ID NO: 129**), генетически слитый посредством жестких линкеров A(EAAAK)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 161) с HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**). Продуцирование ILF в *E. coli* выполняли, как описано в Примере 3, с использованием белка, очищенного при помощи аффинного захвата, ионообмена и препаративной эксклюзионной хроматографии. Чистоту белка оценивали с использованием SDS-PAGE и эксклюзионной ВЭЖХ. Было обнаружено, что полипептиды AFFIMER® имеют чистоту от 99,8% до 100% (**Фиг. 14**). Кинетический анализ Biacore показал, что генетически слитые димеры AFFIMER® способны взаимодействовать с обоими белками-мишенями (**Фиг. 15A**). Было обнаружено, что полипептид AVA04 AFFIMER® связывал PD-L1 и HSA-41 (**SEQ ID NO:116**) и связывался с HSA. Анализы Biacore осуществляли, как описано в Примере 3 для анализа связывания HSA и как описано в Примере 8 для анализа связывания PD-L1-Fc (**Таблица 10**).

Чтобы оценить, влияет ли добавление HSA-41 в различных положениях в формате линейного слияния AFFIMER® на связывание AVA04-251 с PD-L1 человека, анализ ELISA для оценки связывания PD-L1 осуществляли с тремя (3) ILF форматированными полипептидами AFFIMER® (**Фиг. 16**). Вкратце, химерный белок PD-L1-Fc человека (R&D Systems) наносили на 96-луночные планшеты при 0,5 мг/мл в карбонатном буфере. После насыщения буфером 5% казеин/PBS планшеты промывали и разведение полипептидов AFFIMER® или контролей инкубировали в течение 90 минут. Затем планшеты промывали и в течение 1 часа добавляли биотинилированные поликлональные антитела против цистатина А (R&D Systems). Планшеты промывали и определяли полипептиды AFFIMER® с использованием стрептавидина-HRP. После последней стадии промывки для проявления добавляли ТМВ и планшеты считывали при 450 нм. Три (3) испытанных конструкции демонстрировали сходные значения EC<sub>50</sub> (в диапазоне от 0,03 до 0,1 нМ) и были идентичны исходной ILF димерной молекуле анти-PD-L1 (AVA04-251 BH (**SEQ ID NO:129**)). Это было подтверждено, когда выполняли биологический анализ блокады PD-

1/PD-L1(Promega), сравнивая полипептид AFFIMER® с продленным временем полужизни с исходной молекулой (Фиг. 17). Биологический анализ блокады PD-1/PD-L1 (Promega) выполняли в соответствии с инструкциями изготовителя в двух повторах, и он показал, что три (3) испытанных конструкции имеют сходные значения  $EC_{50}$  (с разницей в 2 раза) и идентичны исходной димерной молекуле (AVA04-251 BH; SEQ ID NO:129).

Аналогичным образом связывание с человеческим сывороточным альбумином оценивали для трех (3) полипептидов AFFIMER® с увеличенным временем полужизни с использованием ELISA при pH 7,4. Вкратце, HSA наносили на 96-луночные планшеты при 1 мг/мл при pH 7,5. После насыщения 5% казеином/PBS при pH 7,5 планшеты промывали и разведение полипептидов AFFIMER® или контролей инкубировали в течение 90 минут. Затем планшеты промывали и в течение 1 часа добавляли биотинилированные поликлональные антитела против цистатина А (R&D Systems). Планшеты промывали и определяли полипептиды AFFIMER® с использованием стрептавидина-HRP. После последней стадии промывки для проявления добавляли TMB и планшеты считывали при 450 нм. Три (3) испытанных конструкции демонстрировали сходные значения  $EC_{50}$  (в диапазоне от 0,03 до 0,06 нМ) и были идентичны исходной молекуле (HSA-41; SEQ ID NO:116) (Фиг. 18).

Таблица 10

**Кинетический анализ полипептидов AFFIMER® (PD-L1-Fc, HSA) методом BIACORE™**

AFFIMER®	rhPD-L1-Fc					HSA				
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (нМ)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (нМ)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
исходный 251_BH	7,52E+05	1,29E-03	1,71	23	0,154					
AVA 04-251 XT14	8,34E+05	4,20E-04	0,504	24,9	0,355	3,22E+05	2,82E-03	8,75	73,3	0,211
AVA 04-251 XT15	8,63E+05	6,07E-04	0,704	24,3	0,307	5,57E+05	2,90E-03	5,20	75,6	0,202
AVA 04-251 XT16	4,03E+05	9,44E-04	2,34	34,2	0,194	8,21E+05	3,24E-03	3,95	78,5	0,228
Исходный HSA-41						8,48E+05	4,35E-03	5,13	32,1	0,255

Пример 10. Реакция смешанных лимфоцитов при использовании ILF тримера

### **с увеличенным временем полужизни**

Полипептиды AFFIMER® в формате линейного слитого AVA04-251 XT испытывали с использованием анализа реакции смешанных лимфоцитов (MLR) (Фиг. 19). Вкратце, дендритные клетки (DC), происходящие из моноцитов, получали из CD14+ моноцитов, культивируемых в течение семи (7) дней. Незрелые DC использовали на 7-й день и культивировали вместе с аллогенными Т-клетками (отрицательная изоляция) и эталонным веществом или контрольным носителем (среда RPMI-10). Клетки культивировали в течение 4 дней и измеряли IFN $\gamma$  в супернатантах в конце периода культивирования при помощи ELISA. Данные представлены как среднее +/- S.E.M. пг/мл или нормализованы к контролю-носителю (n=6). Пунктирная линия представляет среднее значение для носителя (RPMI-10). Было обнаружено, что форматированный полипептид AFFIMER® AVA04-251 XT14 (SEQ ID NO:123) повышает уровень IFN $\gamma$  аналогично его контролю (без увеличения времени полужизни) (Фиг. 21).

### **Пример 11. Фармакокинетический профиль PD-L1-связывающих линейных слитых полипептидов AFFIMER® с увеличенным временем полужизни у мышей**

ILF AVA04-251 тримеры с увеличенным временем полужизни испытывали в фармакокинетическом исследовании на мышах C57/Bl6. Как описано на Фиг. 20, мышам вводили внутривенно (в/в) дозу 10 мг/кг. Использовали шесть мышей и сыворотку собирали в девяти временных точках (0, 0,25, 6, 24, 72, 120, 168 и 336 часов). Образцы сыворотки для каждой временной точки объединяли и анализировали методом сэндвич-ELISA с использованием очищенных молекул, вводимых в качестве эталонного стандарта. Результаты выражали в процентах от начальной дозы через 15 минут. Белок AFFIMER® ILF без продления времени полужизни (AVA04-251 BH SEQ ID NO:129) имел быстрый клиренс ( $t_{1/2}$  3,2 часа), тогда как все форматы ILF AVA04-251 XT демонстрировали удлинение времени полужизни, оцененное в бета-фазе (в диапазоне от 23,8 до 24,2 часов).

### **Пример 12. Испытание ILF тримера AFFIMER® на модели ксенотрансплантата у мышей**

PBMC выделяли от одного здорового донора. Суммарные Т-клетки выделяли и размножали на клетках A375 в течение двух раундов в течение 7-10 дней в полной среде с добавлением IL-2. Мышам (n=10) инокулировали подкожно в область правого бока опухолевые клетки A375 и активированные Т-клетки (0,2 мл в PBS) для развития опухоли. Обработки начинали через один час после инокуляции клеток. Очищенный белок AVA04-251 XT14 (SEQ ID NO: 123) вводили два (2) раза в неделю в течение трех (3) недель. В целом ингибирование роста опухоли было показано для обоих видов лечения по сравнению с контролем на 13-й день после рандомизации. Более 70% мышей, получавших AVA04-251 XT14 (SEQ ID NO: 123), имели уменьшенный размер опухоли по сравнению с контрольной группой, которой вводили несвязывающий AFFIMER® полипептид ILF SQT gly XT28 (SEQ ID NO: 128) (Фиг. 21A-21C).

### **Пример 13. Экспрессия AVA04 - полипептида AFFIMER® в формате ILF тримера с С-концевым cys и увеличенным временем полужизни**

Тример с увеличенным временем полужизни синтезировали чтобы дополнительно включить С-концевую аминокислоту цистеин, следующую за С-концевой меткой 6xHis, при помощи мутагенеза с быстрым изменением (Agilent) для создания AVA04-251 XT14 cys (**SEQ ID NO: 126**). Белок AFFIMER® получали из *E. coli* и очищали методом аффинной очистки, ионообмена и препаративной эксклюзионной хроматографии, как описано в Примере 3. Анализ очищенного белка в восстанавливающих условиях с 2 мМ ТСЕР показал, что чистота конечного белка составляет >97% (**Фиг. 22**). Таким образом, белки AFFIMER® ILF могут быть получены со свободным цистеином для последующей конъюгации с использованием малеимидной химии, что позволит получить конъюгаты белок AFFIMER®-лекарственное средство.

**Пример 14: Фармакокинетический профиль HSA-41 у дважды трансгенных мышей, гуманизированных по FcRn и сывороточному альбумину**

Как было показано ранее, время полужизни белка HSA AFFIMER® коррелирует с его аффинностью связывания с сывороточным альбумином. HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**) имеет значительно более высокую аффинность к человеческому сывороточному альбумину, чем к мышинному. Таким образом, фармакокинетический профиль лидерной молекулы HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**) оценивали на дважды трансгенной мышинной модели с гуманизированным неонатальным Fc-рецептором (FcRn)/человеческим сывороточным альбумином, чтобы более точно имитировать физиологические взаимодействия, обнаруженные у людей. Как описано **Фиг. 23**, мышам вводили внутривенно (в/в) дозу 10 мг/кг. Инъекции вводили девяти мышам и сыворотку собирали в 10 (десяти) временных точках (до 336 часов). Образцы сыворотки для каждой временной точки объединяли и анализировали методом сэндвич-ELISA с использованием молекул, введенных в качестве эталонного стандарта. Результаты выражали в процентах от максимума концентрации. Время полужизни включающего полипептид AFFIMER® белка HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**) оценивали в бета-фазе примерно во временной точке 145 часов на этой модели трансгенных мышей.

**Пример 15: Фармакокинетический профиль 3 лидерных полипептидов AFFIMER® у яванского макака**

Три (3) белка AFFIMER®, HSA-18 (**SEQ ID NO: 110**), HSA-31 (**SEQ ID NO: 113**) и HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**), показали различные PK профили у мышей. Полипептиды AFFIMER® вводили в дозе 5 мг/кг в виде болюсной внутривенной (в/в) инъекции двум (2) животным на группу (одному самцу и одной самке). Концентрацию белка AFFIMER® в сыворотке определяли для 14 (четырнадцати) временных точек (0,25-672 часа) в течение 28 (двадцати восьми) дней при помощи ELISA. Все испытанные белки AFFIMER® имели хорошую переносимость *in vivo* (**Фиг. 24** и **Таблица 11**).

**Таблица 11**

**Фармакокинетические параметры белков AFFIMER® у мышей (время полужизни,  $t_{1/2}$ )**

Молекула	ID животного	$t_{1/2}$ (часы)
HSA-41	171763	134,8

	171764	183,2
HSA-18	171667	160,0
	171683	127,7
HSA-31	161603	6,9
	171704	0,59

**Пример 16. Линейный слитый тримерный AFFIMER® с увеличенным временем полужизни в качестве связующего, направленного против мышинового PD-L1**

ILF тример AVA04-182 XT20 (SEQ ID NO: 127) с увеличенным временем полужизни получали из *E. coli*. Анализы SDS-PAGE и эксклюзионной ВЭЖХ осуществляли, как описано в примере 2, и они показали конечную чистоту белка более >98% (FIG 25A). Очищенный белок анализировали методом Biacore для оценки его аффинности к мышиному PD-L1-Fc меченному рекомбинантному антигену (R&D systems). Антиген захватывали с использованием чипа с белком A (GE Healthcare), а ILF формат AFFIMER® анализировали в качестве аналита с использованием одноциклового кинетики титрования от максимальной концентрации 1 нМ и регенерации с использованием 10 мМ глицина, pH 1,5 (GE Healthcare). Из кинетических данных Fc2-1 вычитали значение холостой пробы и подгоняли к 1:1 модели связывания Ленгмюра (программное обеспечение BIAcore Evaluation; GE Healthcare), с получением значения  $K_D$ , равного 90,6 пМ, подтверждая, что добавление продлевающего время полужизни полипептида AFFIMER® в этом формате не влияло на связывание AVA04-182 с мышиным PD-L1 антигеном-мишенью (Фиг. 25B).

AVA04-182 XT20 (SEQ ID NO: 127) ILF оценивали при помощи ELISA на его способность связывать HSA при pH 7,4 и pH 6,0 (как описано в Примере 4). Фиг. 26A и 26B показывают, что AVA04-182 XT20 сохранял способность HSA-41 связывать MSA. Кроме того, для оценки функциональности полипептида AFFIMER® с увеличенным временем полужизни осуществляли конкурентный ELISA (mPD-1/mPD-L1). Вкратце, PD-L1 наносили на планшет в течение ночи при 1 мкг/мл в карбонатном буфере. Затем планшеты насыщали буфером 5% казеин/PBS. Тем временем mPD-L1 предварительно инкубировали с разведением полипептида AFFIMER® с увеличенным временем полужизни и его контролем. После насыщения смесь добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут. Затем планшеты промывали и добавляли детекторное поликлональное антитело, биотинилированное анти-PD-L1. После промывки планшетов добавляли стрептавидин-HRP в течение 30 минут. После конечной промывки выполняли проявление реакции с использованием TMB (Pierce) и планшеты считывали с использованием планшет-ридера при 450 нм (Фиг. 26C). На Фиг. показано, что полипептид AFFIMER® с увеличенным временем полужизни обладает такой же нейтрализующей способностью, что и его исходная молекула.

В качестве подтверждения концепции было проведено фармакокинетическое исследование на мышах. Двенадцати животным в группе интраперитонеально (и/п) вводили 25 мг/кг полипептида AFFIMER®. Использовали по три животных на каждую

временную точку. В восьми (8) временных точках брали сыворотку вплоть до 336 часов после инъекции. Объединенную сыворотку анализировали при помощи ELISA для количественного определения уровня полипептида AFFIMER® в сыворотке. Фармакокинетический профиль полипептида AFFIMER® с увеличенным временем полужизни показал, что время полужизни составляло ~17 часов в этом исследовании (Фиг. 27).

**Пример 17: Биораспределение AVA04-251 BH-800CW в модели мышинного ксенотрансплантата A375**

Для оценки, нацелены ли анти-PD-L1 полипептиды AFFIMER® на опухоли, экспрессирующие PD-L1 человека, использовали модель ксенотрансплантата мыши, исследуя биораспределение полипептида AFFIMER®, конъюгированного с IR-красителем, в течение определенного времени с использованием флуоресцентной визуализации. AVA04-251 BH cys (SEQ ID NO:130) и AVA04-251 XT14 cys (SEQ ID NO: 126) конъюгировали с IRDye 800CW (LI-COR) посредством малеимидной химии для модификации доступных аминогрупп в белке. Полипептиды AFFIMER® разводили до концентрации 1 мг/мл в 50 mM MES, pH 6, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP и инкубировали с IRDye 800CW (4 мг/мл в воде) при стехиометрии 9:1 краситель:белок в течение 2 часов в темных условиях при комнатной температуре (~23°C). Свободный краситель отделяли от конъюгированных с красителем полипептидов AFFIMER® с использованием 5-мл колонки для обессоливания Zeba Spin (MWCO 7000; Pierce) в соответствии с инструкциями изготовителя. Соотношение краситель:белок рассчитывали на основании поглощения при 280 и 780 нм в соответствии с уравнением:

Соотношение краситель:белок =  $(A_{780}/\epsilon_{\text{Красителя}})/(A_{280} - (0,03 \times A_{780}))/\epsilon_{\text{белка}}$ ,

где 0,03 представляет собой поправочный коэффициент для поглощения IRDye 800CW при 280 нм, и  $\epsilon_{\text{Красителя}}$  и  $\epsilon_{\text{белка}}$  представляют собой молярные коэффициенты экстинкции для красителя  $270000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и белка  $39871 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для AVA04-251 BH Cys (SEQ ID NO: 130) и  $37626 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для AVA04-251 XT14 cys (SEQ ID NO: 126), соответственно. Фиг. 28A-28C показывают схему формата и чистоту конъюгированного вещества, определенную с использованием аналитических методов эксклюзионной ВЭЖХ и SDS-PAGE (как подробно описано в Примере 2).

Связывание конъюгированного с красителем AVA04-251 BH-800 или AVA04-251 XT14-800 с рекомбинантным человеческим PD-L1 сравнивали с неконъюгированным полипептидом AFFIMER® с использованием анализа связывания PD-L1 методом ELISA.

Вкратце, человеческий PD-L1 Fc (R&D Systems) химерный белок наносили на 96-луночные планшеты при 0,5 мкг/мл в карбонатном буфере. После насыщения буфером 5% казеин/PBS планшеты промывали и разведение конъюгированного полипептида AFFIMER® или неконъюгированного контроля инкубировали в течение 90 минут. Затем планшеты промывали, добавляли биотинилированное поликлональное анти-цистатин А антитело (R&D Systems) и планшеты инкубировали в течение 1 часа. Планшеты промывали и определяли связанный полипептид AFFIMER® с использованием

стрептавидина-HRP. После последней стадии промывки добавляли TMB и планшеты считывали при 450 нм. Конъюгированный полипептид AFFIMER® показал значение EC<sub>50</sub>, сходное с исходной молекулой. Таким образом, на основании сопоставимых кривых связывания (**Фиг. 29**), было показано, что конъюгация красителя не влияет на аффинность обеих конъюгированных форматированных молекул в отношении мишени PD-L1.

Модель ксенотрансплантата мыши A375 была создана у самок бестимусных голых мышей (Charles River Laboratories) после введения в бок животного подкожной инъекции клеток A375 ( $5 \times 10^6$  клеток [ATCC] в 100 мкл стерильного PBS). Опухоли контролировали три (3) раза в неделю, при этом развивающуюся опухоль измеряли штангенциркулем. Опухолям давали вырасти до 500-1000 мм<sup>3</sup> перед внутривенным введением AVA04-251 BQ-800 и BH-800 (при 1 нмоль) в хвостовую вену трем (3) мышам. Флуоресцентные изображения регистрировали с использованием биофотонного устройства визуализации Xenogen IVIS 200 сразу после инъекции (время 0) и через 1, 2, 4, 8, 24 и 48 часов после введения. Во временной точке четыре (4) часа было обнаружено направленное воздействие анти-PD-L1 полипептида AFFIMER® с увеличенным временем полужизни на опухоль. Данные представлены на **Фиг. 30**, и стрелки указывают приблизительное расположение опухоли.

#### **Пример 18: Кристаллизация полипептида AFFIMER® HSA-411 в комплексе с HSA**

HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**) экспрессировали и очищали с использованием NiNTA и препаративной эксклюзионной хроматографии из клеток E. coli BL21, как описано в Примере 2. HSA закупали у Sigma № кат. A3782 и восстанавливали до 50 мг/мл. Очищенный полипептид AFFIMER® смешивали с HSA в молярном соотношении 1:1,5 в течение 1 часа при осторожном перемешивании. Образовавшийся белковый комплекс очищали препаративной эксклюзионной хроматографией с использованием 10 mM Трис, pH 7,4, и 150 mM буфера NaCl в качестве подвижной фазы. Элюированные фракции комплекса с соответствующей молекулярной массой концентрировали до 105,3 мг/мл, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Для кристаллографии несколько коммерческих сит были настроены на две температуры: +4°C и +18°C. Осуществляли метод диффузии паров в сидячей капле с использованием 100:100 нл белка к резервуарному раствору. Были установлены следующие кристаллизационные сита: MD JCSG+, MD PACT, MD Proplex, MD Structure и Hampton Salt RX. Наборы данных дифракции собирали на кристаллах (**Фиг. 31A**), полученных из 10 mM гексагидрата хлорида никеля (II), 0,1 M трис-HCl pH 8,5 и 20% масс./об. PEG 2000 MME-полученных кристаллов. Данные собирали с использованием источника света Diamond, UK. Набор дифракционных данных является практически полным до 3,05 Å<sup>2</sup> (трехмерная кристаллическая структура белкового комплекса (**Фиг. 31B**)). Было показано, что HSA-41 (**SEQ ID NO: 116**) связывается с доменом II HSA в основном за счет взаимодействий петли 2 полипептида AFFIMER®, поскольку электронная плотность указывает на ковалентную модификацию ионами Ni<sup>2+</sup> на поверхности белков, что, вероятно,

способствовало кристаллизации. Общая область взаимодействия  $880 \text{ \AA}^2$  имеет место в основном за счет связывающей петли 2, которая, как было обнаружено, образует структуру альфа-спирали внутри петли, а поверхность раздела характеризуется смесью гидрофильных и гидрофобных взаимодействий. Петля 4 охватывает несколько взаимодействий. **Фиг. 31С, 31D и Таблица 12** показывают специфические аминокислотные взаимодействия между полипептидом AFFIMER® и HSA.

Таблица 12

**Предсказанные на основании кристаллической структуры аминокислотные взаимодействия полипептида AFFIMER® HSA-41 с HSA**

Тип взаимодействия	Аминокислота антигена HSA	Аминокислота AFFIMER® HSA-41
Водородная связь	T236	D93
Водородная связь	A320	K77
Водородная связь	E321	Q46/A49/N61/K77
Соляной мостик	D308/E333	R54/R55
Гидрофобное взаимодействие	L48	F228
Гидрофобное взаимодействие	F51	A229
Гидрофобное взаимодействие	F52	A322
Гидрофобное взаимодействие	W56	V325
Гидрофобное взаимодействие	F79	F326
Гидрофобное взаимодействие	V95	M329

**Пример 19: Мутации петли 2 и 4 HSA-41 с использованием метода сканирования аланином**

Полипептид AFFIMER® HSA-41 (SEQ ID NO. 116) был мутирован с использованием сайт-направленного мутагенеза для мутации до аланиновых остатков каждой аминокислоты в петле 2 и петле 4, чтобы определить, какие аминокислоты взаимодействуют с антигеном-мишенью. Конечные клоны были проверены на последовательности, продуцированы из E.coli и аффинно очищены, как описано в Примере 3. В общей сложности восемнадцать (18) аланиновых мутантов сравнивали после одностадийной очистки эксклюзионной ВЭЖХ на чистоту белка и реакцию связывания с HSA при pH 7,4 на Biacore при 50 нМ (стандартная концентрация белка AFFIMER®). Данные показали, что петля 2 активно участвует в связывании с мишенью, при этом остатки 51, 52, 55, 56 и 58 теряют сигнал связывания при мутации в аланин. В петле 4 первое положение 84 теряет способность к связыванию при мутации в аланин, а остальная часть петли в меньшей степени участвует в связывании (**Таблица 13**). Данные эксклюзионной ВЭЖХ показали, что положения 50 и 55 петли 2 могут участвовать в самоассоциации, поскольку чистота белка снижалась при замене любого из них на аланин.

## Результаты скрининга аланиновых мутантов

Мутант связывающей петли	Мутант Affimer	SEQ ID NO:	Связывание HSA, Biacore (RU) (белок AFFIMER® 50 нМ)	Чистота по данным эксклюзионной ВЭЖХ (%)
NA	Исходный HSA-41 AH	116	36,8	N/A
2	N50A	143	13	36,512
2	F51A	144	2,8	80,72
2	F52A	145	2,2	72,01
2	Q53A	146	23,5	84,08
2	R54A	147	11,9	72,18
2	R55A	148	2,9	50,51
2	W56A	149	2,6	90,10
2	P57A	150	23,2	77,36
2	G58A	151	6,5	73,91
4	W83A	152	2,9	89,35
4	K84A	153	23,5	84,51
4	F85A	154	26,6	90,41
4	R86A	155	19,1	88,02
4	N87A	156	25,8	85,22
4	T88A	157	27,9	85,43
4	D89A	158	26,1	94,13
4	R90A	159	17,2	78,86
4	G91A	160	17,8	79,01

**Пример 20: HSA-41 мутанты с нокаутом петли 4**

На основании разрешенной кристаллической структуры HSA-41 (SEQ ID NO: 116) (Пример 18) и экспериментов со сканированием аланином (Пример 19) было показано, что HSA-41 связывает HSA преимущественно через петлю 2. Полипептиды AFFIMER® были сконструированы для нокаута петли 4 либо путем делеции (SEQ ID NO: 141), либо замены петли 9 глициновыми остатками (SEQ ID NO: 142). Эти мутанты утратили способность связываться с антигеном-мишенью, демонстрируя, что петля 4 необходима для того, чтобы HSA-41 связывался с мишенью, и для увеличения времени полужизни (Фиг. 36).

**Пример 21: Авидность ILF гомодимеров HSA-41**

Полипептиды AFFIMER® подвергали генетическому слиянию с образованием ILF

гомодимеров с жесткими (HSA-41 BK; SEQ ID NO: 131) или гибкими (HSA-41 DI; SEQ ID NO: 132) повторяющимися линкерами (схематические иллюстрации на Фиг. 32А). Полипептиды AFFIMER® получали и очищали из *E. coli*, как описано в Примере 3. Кинетический анализ Вiascore выполняли при pH 7,4 для связывания с иммобилизованным HSA (как описано в Примере 3). Анализ показал avidность при слиянии полипептидов AFFIMER® со значениями  $K_D$  в пМ диапазоне по сравнению с нМ значениями для мономера, связывающегося с HSA (Фиг. 32В и 32С).

**Пример 22: Инкубация HSA-41 с сывороточным альбумином, определение характеристик методом эксклюзионной ВЭЖХ**

Полипептид AFFIMER®, HSA-41 (SEQ ID NO: 116), инкубировали с HSA (Sigma) в соотношении 1:1 или 1:2 в течение времени от одного до четырех часов. Общую массу комплекса HSA-41 AFFIMER®:HSA сравнивали с массой контролей слитого белка AFFIMER®-Fc (80,5 кДа) с использованием колонки для эксклюзионной ВЭЖХ Acclaim-300 (Thermo). Результаты показали ожидаемую молекулярную массу (MW) 83 кДа комплекса со стехиометрией связывания 1:1 через один час (Фиг. 33А-33С). Такие же эксперименты осуществляли с инкубациями форматов димерных ILF белков: HSA-41 DI (SEQ ID NO: 132) или HSA-41 BK (SEQ ID NO: 131). ILF белки инкубировали с HSA в течение четырех часов (Фиг. 34). Анализ этих образцов методом эксклюзионной ВЭЖХ осуществляли на колонке Yarra-3000 (Phenomenex), и данные показали стехиометрию связывания 2:1 HSA:ILF димер AFFIMER® с обоими полипептидами AFFIMER® в ILF формате, связывающимися с HSA одновременно. Комплексы ILF димер:HSA выходили из колонки с массой ~160 кДа, более высокой молекулярной массой, чем масса контрольного моноклонального антитела 150 кДа на (Фиг. 34).

**Пример 23: Фармакокинетический анализ мономера HSA-41 и ILF димера у мышей C57BL/6**

Девяти (9) мышам дикого типа C57BL/6 внутривенно вводили 10 мг/кг полипептида AFFIMER® и образцы крови собирали в 10 временных точках (0,25 мин и 2, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 336 и 504 часов). Получали сыворотки и замораживали до анализа. Для каждой временной точки сыворотки объединяли и осуществляли детекцию и количественное определение полипептидов AFFIMER® с использованием анти-цистатин сэндвич-ELISA. Проанализированные данные показали, что удлинение времени полужизни, рассчитанное по бета-фазе мономера AFFIMER® (72 часа), еще больше увеличивалось с использованием ILF димера HSA-41 DI (103 часа) у мышей дикого типа (Фиг. 35).

**Пример 24: Эпитоп-специфическая сортировка направленных против сывороточного альбумина связующих**

Анализ методом гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) использовали для эпитоп-специфической сортировки. Анализ использовали для скрининга полипептидов AFFIMER®, связывающихся сывороточный альбумин, на связывание с биотинилированным сывороточным альбумином человека, связанным с HSA-41 Msc His.

Взаимодействие между HSA-41 Мус His и биотинилированным HSA осуществляли с использованием стрептавидина, меченного донором криптата тербия, и анти-Мус, меченного акцептором d2. Все белки AFFIMER®, испытанные в конкурентном анализе, были получены без Мус-меток (HSA-18, -20 и -36) и показали ингибирование взаимодействия между HSA-41 Мус His и биотинилированным HSA, за исключением HSA-31, из чего можно заключить, что он связывается с другим эпитопом (Фиг. 37).

**Пример 25: Характеристика формата HSA-41 со свободным С-концевым цистеином (CQ)**

Полипептид AFFIMER® HSA-41 (SEQ ID NO: 116) был генетически сконструирован для вставки свободного цистеинового остатка в области С-концевой метки HSA-41 с получением CQ HSA-41 (SEQ ID NO. 138), который экспрессируется с С-концевыми метками Мус Cys TEV His. HSA-41 CQ можно использовать для конъюгации с использованием малеимидной химии, например, для увеличения времени полужизни полипептида. Cys вариант полипептида AFFIMER® (HSA-41 CQ) очищали в присутствии восстановителя 5 mM TCEP и охарактеризовали методом SDS-PAGE и эксклюзионной ВЭЖХ в восстанавливающих условиях (Фиг. 38А-38В). Кинетический анализ Biacore на связывание с HSA при pH 7,4 выполняли, как описано в Примере 3. Было обнаружено, что HSA-41 CQ сопоставим с мономером без свободного С-концевого Cys, со значением KD ~3нМ (Фиг. 39).

**Пример 26: Форматирование AVA04-251 XT ILF с продлевающими время полужизни полипептидами AFFIMER® HSA-18**

Были разработаны два тримерных линейных слитых (ILF) формата AFFIMER®. Каждый включал два слитых связывающих человеческий PD-L1 полипептида AFFIMER®, AVA04-251, которые затем были слиты с HSA-18 (SEQ ID NO: 110) для продления времени полужизни. AVA04-251 XT60 (SEQ ID NO. 139) включал продлевающий время полужизни полипептид AFFIMER®, расположенный на С-конце, тогда как AVA04-251 XT61 (SEQ ID NO. 140) включал продлевающий время полужизни полипептид AFFIMER® в середине формата, разделяя два анти-PD-L1 полипептида AFFIMER® (схематические диаграммы, Фиг. 40). Форматы были сконструированы с повторяющимися жесткими генетическими линкерами A(EAAAK)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 161) между полипептидами AFFIMER®. Тримеры AFFIMER® получали из E.coli и очищали при помощи аффинной смолы NiNTA с последующим препаративным разделением по размеру, как описано в Примере 2. Восстановительный SDS-PAGE и метод эксклюзионной ВЭЖХ показали, что конечная чистота белковых форматов составляла >98% (Фиг. 40).

**Пример 27: Связывание имеющего увеличенное время полужизни AVA04-251 XT60 и AVA04-251 XT61 ILF формата с сывороточным альбумином**

Кинетический анализ Biacore сывороточного альбумина человека (HSA) осуществляли с pH 6,0 и с pH 7,4 подвижным буфером с использованием способа, ранее описанного в Примере 3. Данные показали, что ILF форматы, содержащие продлевающий

время полужизни полипептид AFFIMER® HSA-18 (SEQ ID NO: 110), связывали HSA с аффинностью (KD) при pH 7,4, выраженной в нМ трехзначным числом, и с аффинностью при pH 6,0, выраженной в нМ двузначным числом, в 2-4 раза превышающей аффинность мономера HSA-18, равную 109-152 нМ (Фиг. 41А-41В). Для мышинового сывороточного альбумина (MSA) в условиях pH 6,0 аффинность связывания ILF форматов была примерно в 2 раза выше, чем у связывающего сывороточный альбумин мономерного полипептида AFFIMER®, (Фиг. 43).

**Пример 28: Связывание имеющего увеличенное время полужизни AVA04-251 XT60 и AVA04-251 XT61 ILF формата с сывороточным альбумином**

Связывание с человеческим сывороточным альбумином и мышинным сывороточным альбумином оценивали для двух ILF форматов AFFIMER® с увеличенным временем полужизни (AVA04-251 XT60, SEQ ID NO: 139; AVA04-251 XT61, SEQ ID NO: 140) при pH 7,4 с использованием ELISA. Вкратце, HSA или MSA наносили на 96-луночные планшеты при 1 мг/мл при pH 7,5. После насыщения 5% казеином/PBS, pH 7,5, планшеты промывали и разведение тримеров AFFIMER® или контролей инкубировали на планшете в течение 90 минут. Затем планшеты промывали и добавляли биотинилированное поликлональное анти-цистатин А антитело (R&D Systems) в течение 1 часа. Планшеты промывали и определяли ILF AFFIMER® с использованием стрептавидина-HRP. После последней стадии промывки для проявления добавляли TMB и планшеты считывали при 450 нм. Два испытанных ILF, AVA04-251 XT60 и AVA04-251 XT61, продемонстрировали аналогичные значения EC<sub>50</sub> как для HAS (в диапазоне от 5,7 до 8,8), так и для MSA (в диапазоне от 133,6 до 60,8) (Фиг. 42).

**Пример 29: Связывание AVA04-251 XT60 и AVA04-251 XT61 ILF формата с человеческим PD-L1-Fc**

Осуществляли кинетический анализ Вiasore с одноцикловой кинетикой для оценки связывания AVA04-251 XT60 и AVA04-251 XT61 (SEQ ID NO: 139 и 140, соответственно), как описано в Примере 3. Эксперименты выполняли для сравнения тримеров AFFIMER® с HSA-41. Аффинность связывания, KD значения, находились в трехзначном числовом нМ диапазоне, с аналогичными наблюдаемыми скоростями ассоциации и диссоциации, независимо от того, находился ли продлевающий время полужизни полипептид AFFIMER® в середине или в С-концевой области формата (Фиг. 44).

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в настоящей заявке, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждая из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Неопределенные артикли “a” и “an”, при использовании в настоящей заявке в описании и в формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие “по меньшей мере один”.

Следует также понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в настоящей заявке способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок

стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа перечислены.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как “включающий”, “включая”, “несущий”, “имеющий”, “содержащий”, “вовлекающий”, “удерживающий”, “состоящий из” и т.п., следует понимать как неограниченные, т.е. означающие “включая, но не ограничиваясь этим”. Только переходные фразы “состоящий из” и “состоящий по существу из” должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными фразами, соответственно, как указано в Руководстве по процедурам патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03. Термины “около” и “по существу”, предшествующие числовому значению, означают  $\pm 10\%$  от указанного числового значения.

Если представлен диапазон значений, каждое значение между верхним и нижним пределами диапазона конкретно предусматривается и описано в настоящей заявке.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA) с  $K_d 1 \times 10^{-6}$  М или менее при pH 7,4, а при pH 6 связывается с HSA со значением  $K_d$ , которое по меньшей мере на половину log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4.

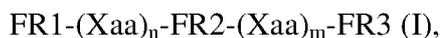
2. Полипептид по п. 1, где полипептид связывается с HSA с  $K_d 1 \times 10^{-7}$  М или менее при pH 7,4,  $K_d 1 \times 10^{-8}$  М или менее при pH 7,4 или  $K_d 1 \times 10^{-9}$  М или менее при pH 7,4.

3. Полипептид по п. 1 или 2, где полипептид при pH 6 связывается с HSA со значением  $K_d$ , которое по меньшей мере на один log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, по меньшей мере на 1,5 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, по меньшей мере на 2 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4, или по меньшей мере на 2,5 log меньше, чем  $K_d$  для связывания с HSA при pH 7,4

4. Полипептид по любому из пп. 1-3, где полипептид имеет время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 10 часов, более 24 часов, более 48 часов, более 72 часов, более 96 часов, более 120 часов, более 144 часов, более 168 часов, более 192 часов, более 216 часов, более 240 часов, более 264 часов, более 288 часов, более 312 часов, более 336 часов или более 360 часов.

5. Полипептид по любому из пп. 1-4, где полипептид имеет время полужизни в сыворотке у пациентов-людей более 50%, более 60%, более 70% или более 80% от времени полужизни HSA в сыворотке.

6. Полипептид по любому из пп. 1-5, включающий аминокислотную последовательность, представленную в общей формуле (I)



где

FR1 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с MIPGGLSEAK PATPEIQEIV DKVKPQLEEK TNETYGTKLEA VQYKTQVLA (SEQ ID NO: 1);

FR2 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с GTNYYIKVRA GDNKYMHLKV FKSL (SEQ ID NO: 2);

FR3 представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность с EDLVLTGYQV DKNKDDDELTG F (SEQ ID NO: 3); и

Xaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту,

n представляет собой целое число от 3 до 20 и m представляет собой целое число от 3 до 20.

7. Полипептид по п. 6, где:

FR1 имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96% или по меньшей мере 98% идентичность с SEQ ID NO: 1;

FR2 имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 92% или по меньшей мере 96% идентичность с SEQ ID NO: 2; и/или.

FR3 имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 3.

8. Полипептид по п. 7, где:

FR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

FR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и/или

FR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

9. Полипептид по п. 6, где аминокислотная последовательность представлена в общей формуле (II)

MIP-Хaa1-GLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTQVLA-  
(Хaa)<sub>n</sub>-Хaa2-TNYYIKVRAGDNKYMHLKVF-Хaa3-Хaa4-Хaa5-(Хaa)<sub>m</sub>-  
Хaa6-D-Хaa7-VLTGYQVDKNKDDELDTGF (SEQ ID NO: 166)(II),

где

Хaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту;

n представляет собой целое число от 3 до 20 и m представляет собой целое число от 3 до 20;

Хaa1 представляет собой Gly, Ala, Val, Arg, Lys, Asp или Glu;

Хaa2 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr;

Хaa3 представляет собой Arg, Lys, Asn, Gln, Ser, Thr;

Хaa4 представляет собой Gly, Ala, Val, Ser или Thr;

Хaa5 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Gly или Pro;

Хaa6 представляет собой Gly, Ala, Val, Asp или Glu; и

Хaa7 представляет собой Ala, Val, Ile, Leu, Arg или Lys.

10. Полипептид по п. 9, где аминокислотная последовательность представлена в общей формуле (III)

MIPRGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKT  
QVLA-(Хaa)<sub>n</sub>-STNYYIKVRAGDNKYMHLKVFNGP-(Хaa)<sub>m</sub>-ADR  
VLTGYQVDKNKDDELDTGF (SEQ ID NO: 167) (III),

где

Хaa, индивидуально для каждого случая, представляет собой аминокислоту; n представляет собой целое число от 3 до 20; и m представляет собой целое число от 3 до 20.

11. Полипептид по любому из пп. 6-10, где (Хaa)<sub>n</sub> представлен формулой (IV)  
aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 180)(IV),

где

aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из D, G, N и V;

aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из W, Y, H и F;

aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из W, Y, G, W и F;

aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из Q, A и P;

aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из A, Q, E, R и S;

aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из K, R и Y;

aa7 представляет собой аминокислоту, выбранную из W и Q;

aa8 представляет собой аминокислоту, выбранную из P и H; и

aa9 представляет собой аминокислоту, выбранную из H, G и Q.

12. Полипептид по любому из пп. 6-11, где  $(Xaa)_n$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-55.

13. Полипептид по п. 12, где  $(Xaa)_n$  представляет собой аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-55.

14. Полипептид по любому из пп. 6-13, где  $(Xaa)_n$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 22, 24, 26, 35, 40, 41 и 45.

15. Полипептид по п. 14, где  $(Xaa)_n$  представляет собой аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 24, 26, 35, 40, 41 и 45.

16. Полипептид по любому из пп. 6-15, где  $(Xaa)_m$  представлен формулой (IV)

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9 (SEQ ID NO: 181)(IV),

где

aa1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Y, F, W и N;

aa2 представляет собой аминокислоту, выбранную из K, P, H, A и T;

aa3 представляет собой аминокислоту, выбранную из V, N, G, Q, A и F;

aa4 представляет собой аминокислоту, выбранную из H, T, Y, W, K, V и R;

aa5 представляет собой аминокислоту, выбранную из Q, S, G, P и N;

aa6 представляет собой аминокислоту, выбранную из S, Y, E, L, K и T;

aa7 представляет собой аминокислоту, выбранную из S, D, V и K;

aa8 представляет собой аминокислоту, выбранную из G, L, S, P, H, D и R; и

aa9 представляет собой аминокислоту, выбранную из G, Q, E и A.

17. Полипептид по любому из пп. 6-16, где  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 57-108.

18. Полипептид по п. 17, где  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 57-108.

19. Полипептид по любому из пп. 6-16, где  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 75, 77, 79, 88, 93, 94 и 98.

20. Полипептид по п. 19, где  $(Xaa)_m$  представляет собой аминокислотную

последовательность любой из SEQ ID NO: 75, 77, 79, 88, 93, 94 и 98.

21. Полипептид по любому из пп. 1-20, где полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 110-116 и 138.

22. Полипептид по п. 21, где полипептид включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 110-116 и 138.

23. Полипептид по любому из пп. 6-10, где  $(Xaa)_n$  представлен формулой (IV)  
aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9(IV),

где

aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa2 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью;

aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью;

aa4 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa5 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa6 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa7 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью;

aa8 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью; и

aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

24. Полипептид по любому из пп. 6-10, где  $(Xaa)_m$  представлен формулой (IV)  
aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9(IV)

где

aa1 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью;

aa2 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa3 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью;

aa4 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa5 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной

боковой цепью;

aa6 представляет собой аминокислоту с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa7 представляет собой аминокислоту с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью;

aa8 представляет собой аминокислоту с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью; и

aa9 представляет собой аминокислоту с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью.

25. Полипептид по п. 23 или 24, где

аминокислота с нейтральной неполярной гидрофильной боковой цепью выбрана из цистеина (C) и глицина (G);

аминокислота с нейтральной неполярной гидрофобной боковой цепью выбрана из аланина (A), изолейцина (I), лейцина (L), метионина (M), фенилаланина (F), пролина (P), триптофана (W) и валина (V);

аминокислота с нейтральной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аспарагина (N), глутамина (Q), серина (S), треонина (T) и тирозина (Y);

аминокислота с положительно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аргинина (R), гистидина (H) и лизина (K); и

аминокислота с отрицательно заряженной полярной гидрофильной боковой цепью выбрана из аспартата (D) и глутамата (E).

26. Полипептид по любому из пп. 1-25, где полипептид включает аминокислотную последовательность, которая включает цистеин.

27. Полипептид по п. 26, где цистеин доступен для химической конъюгации, и при этом необязательно цистеин расположен в С-концевой области или N-концевой области полипептида, и при этом необязательно полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

28. Полипептид по любому из пп. 1-27, дополнительно включающий гетерологичный полипептид, ковалентно связанный через амидную связь с образованием непрерывного слитого белка.

29. Полипептид по п. 28, где гетерологичный полипептид включает терапевтический полипептид.

30. Полипептид по п. 29, где терапевтический полипептид выбран из группы, состоящей из полипептидных гормонов, полипептидных цитокинов, полипептидных хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов.

31. Полипептид по п. 29, где терапевтический полипептид выбран из группы, состоящей из рецепторов-ловушек и лигандов рецепторов.

32. Полипептид по п. 29, где последовательность терапевтического полипептида выбрана из группы, состоящей из ангиогенных агентов и анти-ангиогенных агентов.

33. Полипептид по п. 29, где последовательность терапевтического полипептида представляет собой нейротрансмиттер, и при этом необязательно нейротрансмиттер представляет собой Нейропептид Y.

34. Полипептид по п. 29, где последовательность терапевтического полипептида представляет собой эритропозз-стимулирующий агент, и при этом необязательно эритропозз-стимулирующий агент представляет собой эритропозтин или миметик эритропозтина.

35. Полипептид по п. 29, где терапевтический полипептид представляет собой инкретин, и при этом необязательно инкретин выбран из группы, состоящей из глюкагона, гастроингибирующего пептида (GIP), глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1), глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2), пептида YY (PYY) и оксинтомодулина (ОХМ).

36. Фармацевтическая композиция, подходящая для терапевтического применения у пациента-человека, включающая полипептид по любому из пп. 1-35 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

37. Полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп. 1-36.

38. Полинуклеотид по п. 37, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с последовательностью регуляции транскрипции.

39. Полинуклеотид по п. 38, где последовательность регуляции транскрипции выбрана из группы, состоящей из промоторов и энхансеров.

40. Полинуклеотид по п. 38 или 39, дополнительно включающий точку начала репликации, элемент поддержания минихромосомы (ММЕ) и/или элемент ядерной локализации.

41. Полинуклеотид по любому из пп. 38-40, дополнительно включающий сигнальную последовательность полиаденилирования, функционально связанную и транскрибируемую с последовательностью, кодирующей полипептид.

42. Полинуклеотид по любому из пп. 38-41, где последовательность, кодирующая полипептид, включает по меньшей мере одну интронную последовательность.

43. Полинуклеотид по любому из пп. 38-42, дополнительно включающий по меньшей мере один сайт связывания рибосомы, транскрибируемый с последовательностью, кодирующей полипептид.

44. Полинуклеотид по любому из пп. 38-43, где полинуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК).

45. Полинуклеотид по любому из пп. 38-43, где полинуклеотид представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК).

46. Вирусный вектор, включающий полинуклеотид по любому из пп. 38-45.

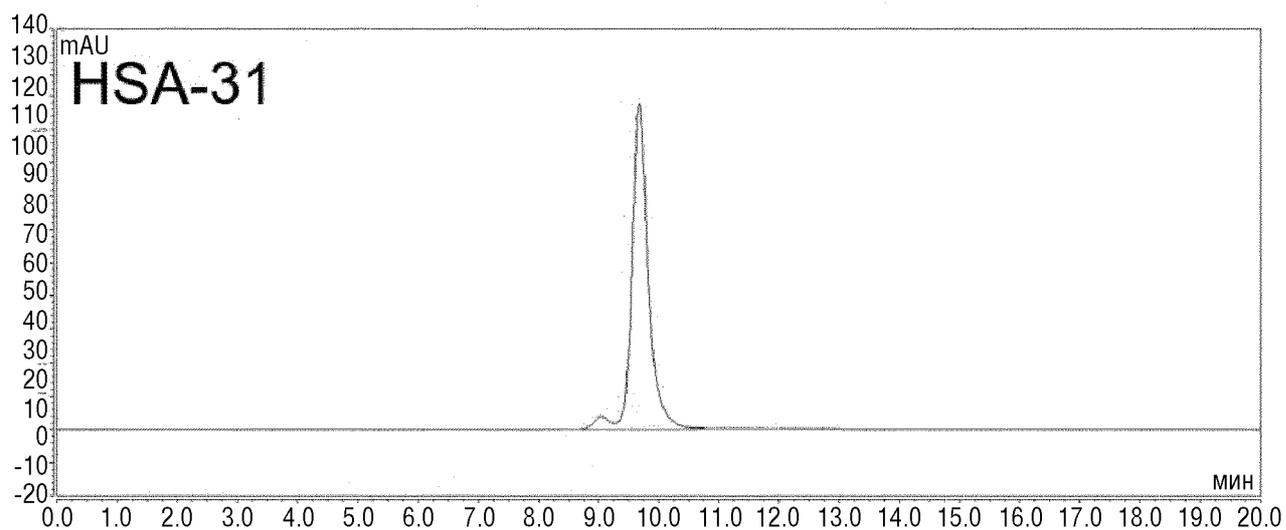
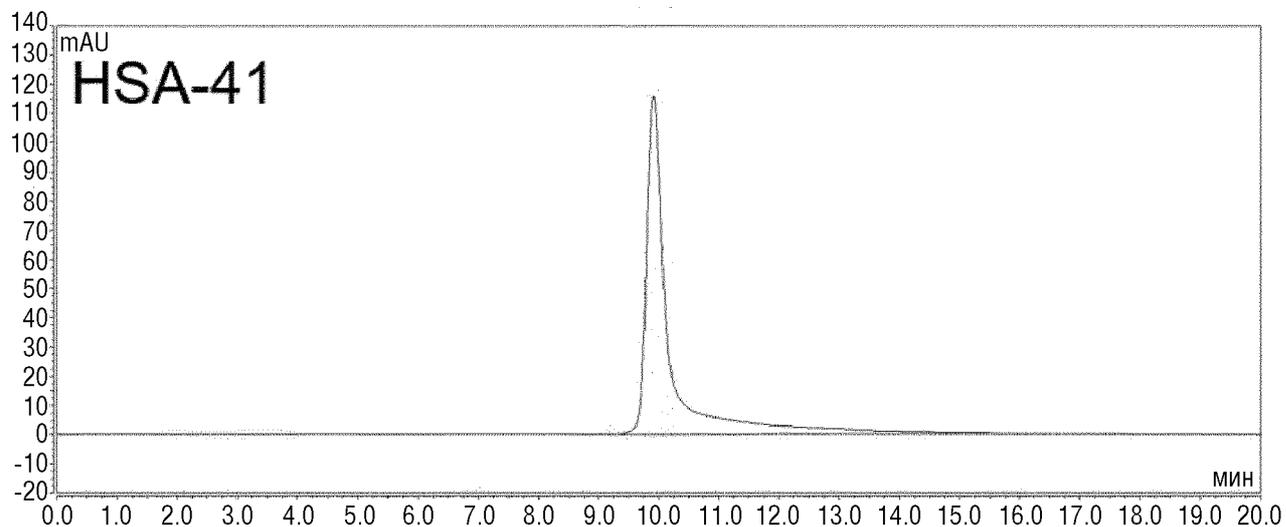
47. Плазида или миникольцо, включающие полинуклеотид по любому из пп. 38-46.

48. Слитый белок, включающий полипептид по любому из предшествующих пунктов.

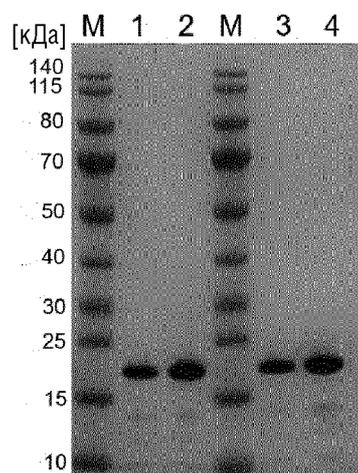
49. Слитый белок по п. 48, дополнительно включающий линкер.
50. Слитый белок по п. 49, где линкер представляет собой жесткий линкер.
51. Слитый белок по п. 50, где жесткий линкер включает последовательность SEQ ID NO: 161.
52. Слитый белок по п. 49, где линкер представляет собой гибкий линкер.
53. Слитый белок по п. 50, где гибкий линкер включает последовательность SEQ ID NO: 165.
54. Слитый белок по любому из пп. 48-53, включающий два полипептида по любому из предшествующих пунктов.
55. Слитый белок по любому из пп. 48-54, дополнительно включающий терапевтическую молекулу.
56. Слитый белок по п. 55, где терапевтическая молекула представляет собой терапевтический полипептид.
57. Слитый белок по п. 56, где терапевтический полипептид выбран из гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов или выбран из антагонистов гормонов, цитокинов, хемокинов, факторов роста, гемостатически активных полипептидов, ферментов и токсинов.
58. Слитый белок по любому из пп. 48-57, где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110.
59. Слитый белок по любому из пп. 48-57, где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.
60. Слитый белок по любому из пп. 48-57, где полипептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116.



ФИГ.3А



ФИГ.3В



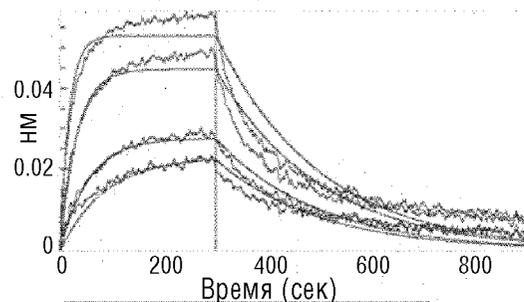
Дорожка	Восстановленный образец SDS-PAGE
M	Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler
1	HSA-31 2 мкг
2	HSA-31 5 мкг
3	HSA-41 2 мкг
4	HSA-41 5 мкг

# ФИГ.4А

## HSA-20

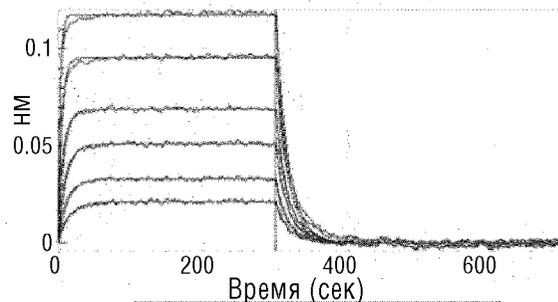
HSA

pH 6.0



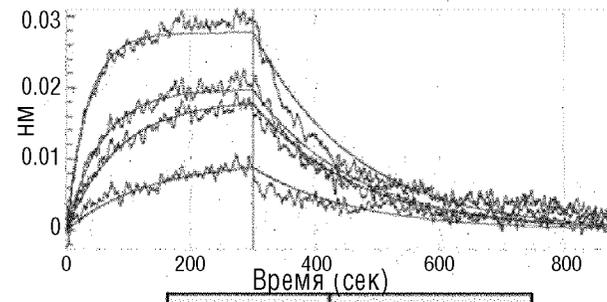
KD (нМ)	23.4
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.011 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$2.135 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9556

MSA



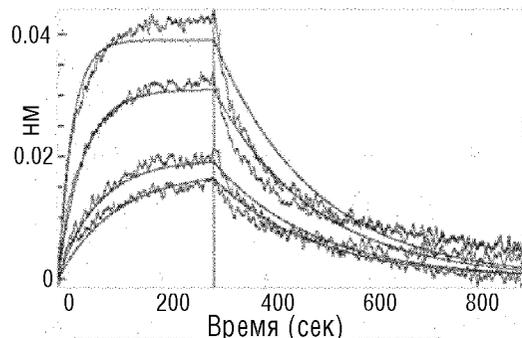
KD (нМ)	511
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.958 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.166 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9986

CSA

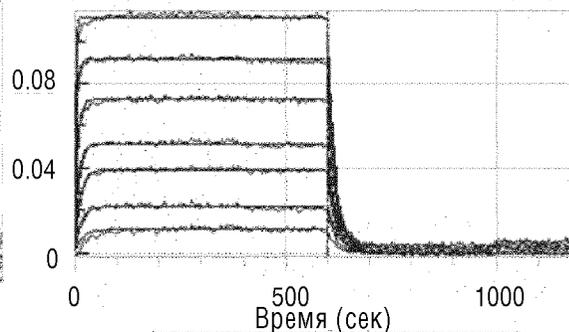


KD (нМ)	133
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$6.115 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$4.570 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9655

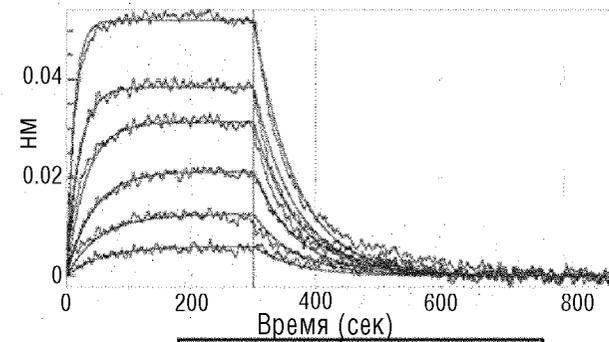
pH 7.4



KD (нМ)	40.5
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.168 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.276 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9615



KD (нМ)	622
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.090 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$8.183 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9958



KD (нМ)	212.6
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$1.479 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$6.956 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9934

# ФИГ.4В

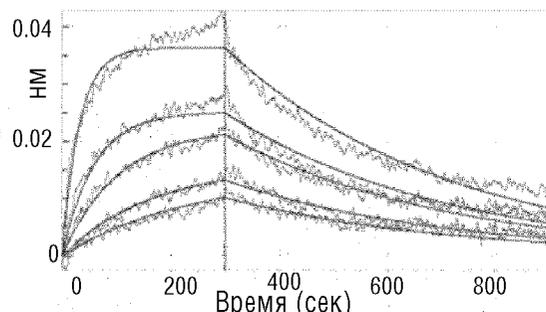
## HSA-31

HSA

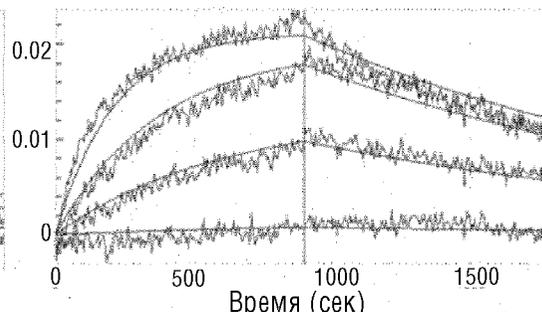
MSA

CSA

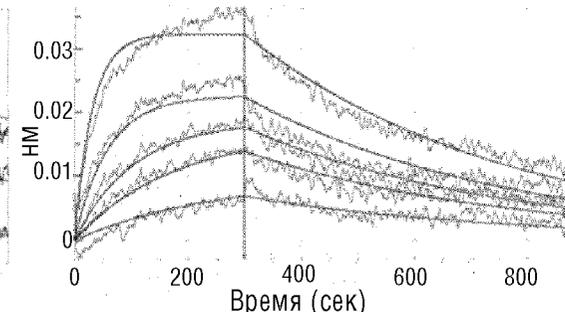
pH 6.0



KD (нМ)	21.1
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$2.452 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.161 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9747

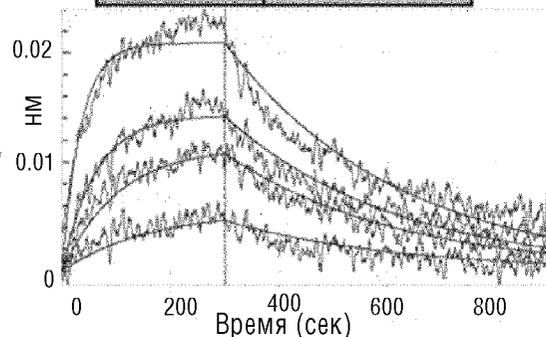


KD (нМ)	3.7
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$6.097 \times 10^{-5}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.656 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9743

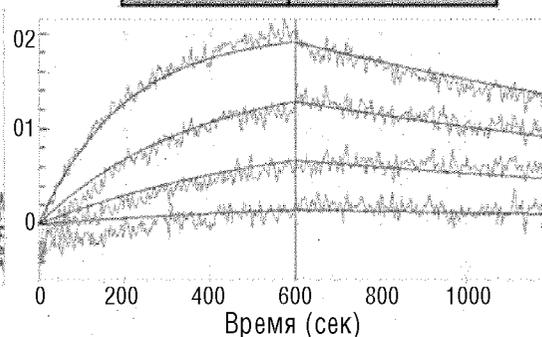


KD (нМ)	18.5
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$2.183 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.182 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9644

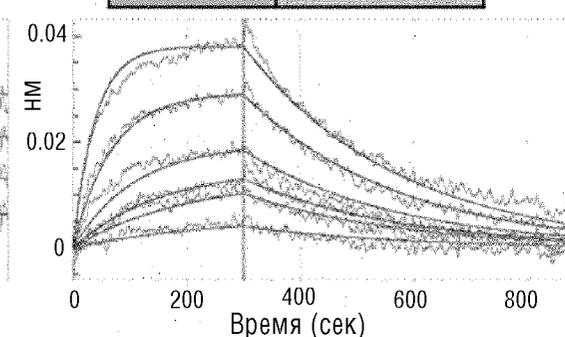
pH 7.4



KD (нМ)	15.3
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$3.175 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$2.076 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9647



KD (нМ)	3.27
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.746 \times 10^{-4}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.757 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9712



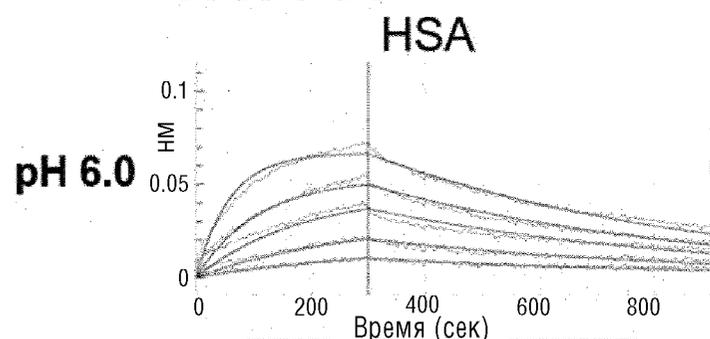
KD (нМ)	83.0
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$3.701 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$4.458 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9813

4/43

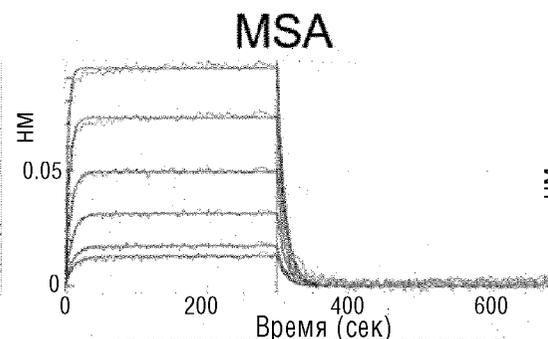
4/45

# ФИГ.4С

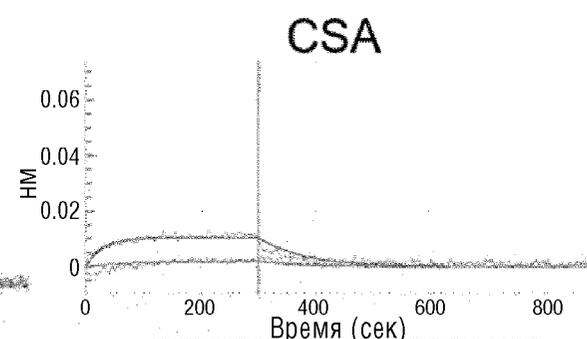
## HSA-36



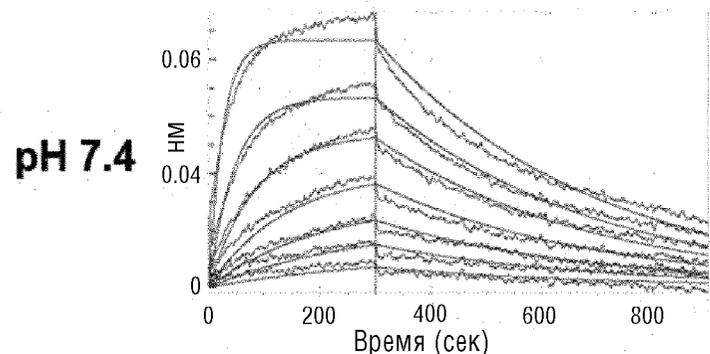
KD (нМ)	132.2
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$1.746 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.542 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9822



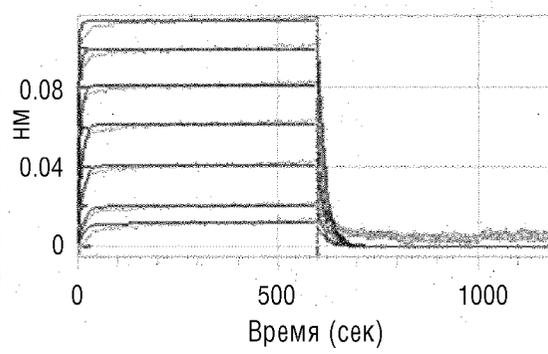
KD (нМ)	435
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$8.739 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$2.0005 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9977



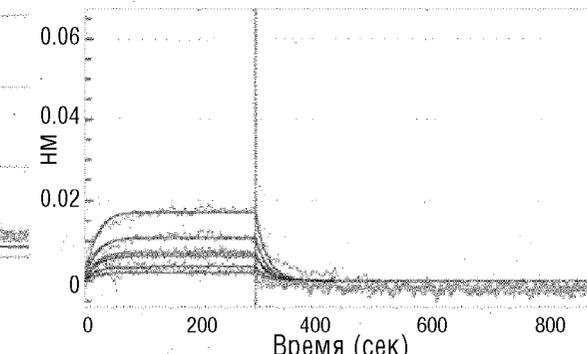
KD (нМ)	~1140
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$1.233 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.077 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.8886



KD (нМ)	135.8
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$2.569 \times 10^{-3}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.892 \times 10^4$
R <sup>2</sup>	0.9854



KD (нМ)	243.6
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.230 \times 10^{-1}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$2.147 \times 10^5$
R <sup>2</sup>	0.9895

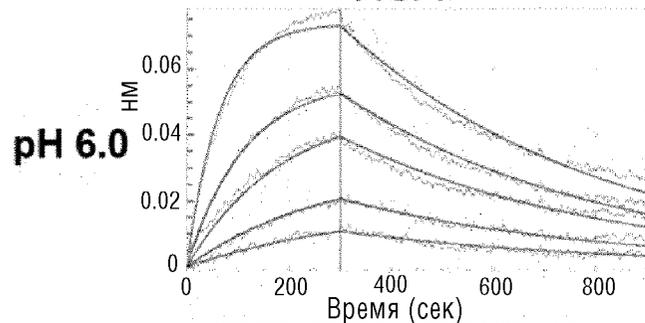


KD (нМ)	~2600
Kdis (с <sup>-1</sup> )	$5.045 \times 10^{-2}$
Kon (Мс <sup>-1</sup> )	$1.903 \times 10^3$
R <sup>2</sup>	0.8915

# ФИГ.4D

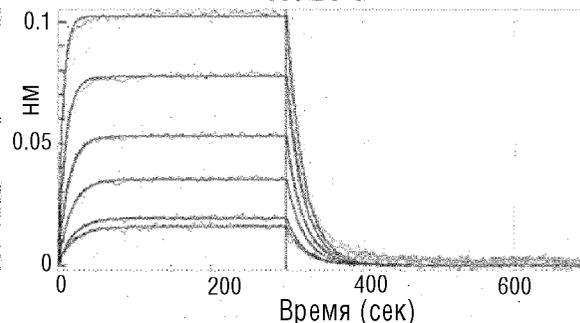
## HSA-41

HSA



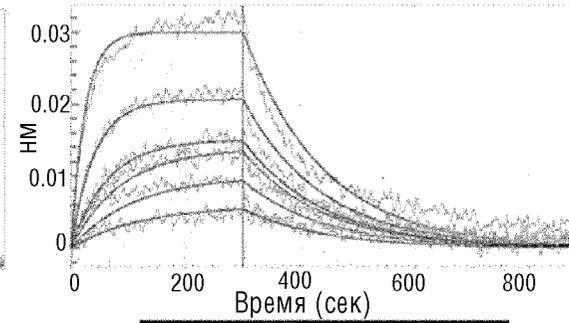
<b>KD (нМ)</b>	<b>7.1</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.977 x 10<sup>-3</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>2.781 x 10<sup>5</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9917</b>

MSA



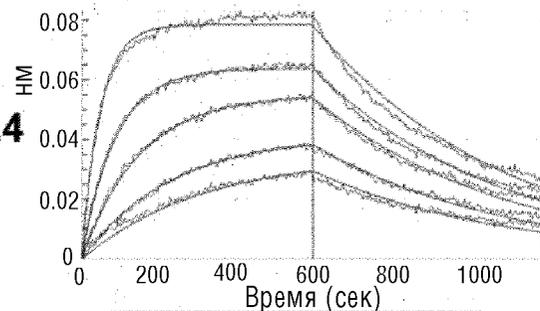
<b>KD (нМ)</b>	<b>95.2</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>4.470 x 10<sup>-2</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>4.695 x 10<sup>5</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9966</b>

CSA

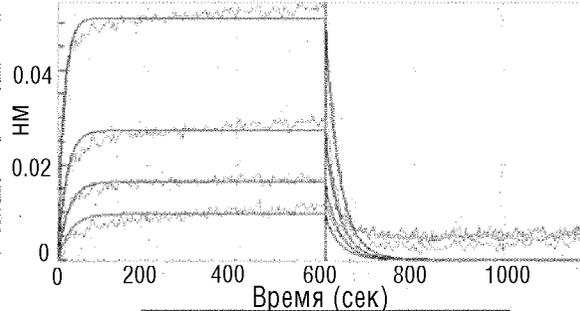


<b>KD (нМ)</b>	<b>105.3</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>7.170 x 10<sup>-3</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>6.807 x 10<sup>4</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9689</b>

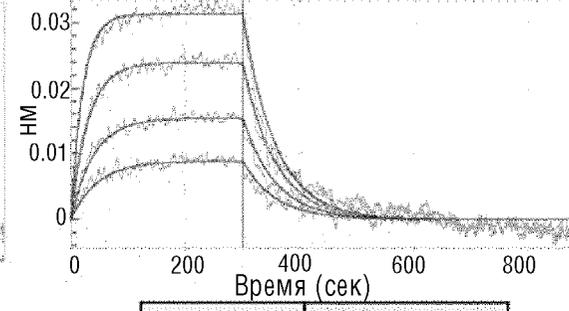
pH 7.4



<b>KD (нМ)</b>	<b>5.24</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.985 x 10<sup>-3</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>3.792 x 10<sup>5</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9936</b>

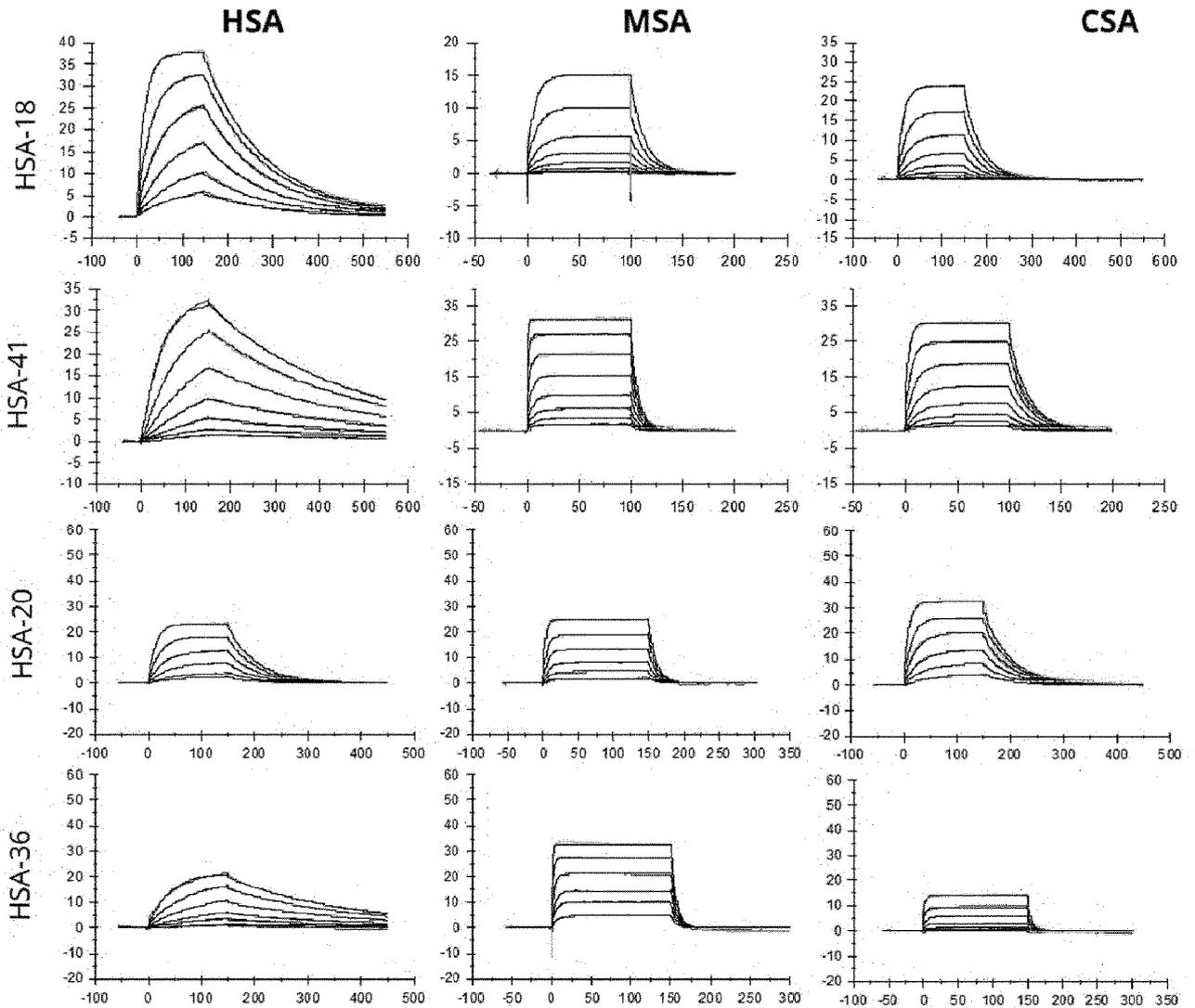


<b>KD (нМ)</b>	<b>47.9</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>3.178 x 10<sup>-2</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>6.630 x 10<sup>5</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.947</b>

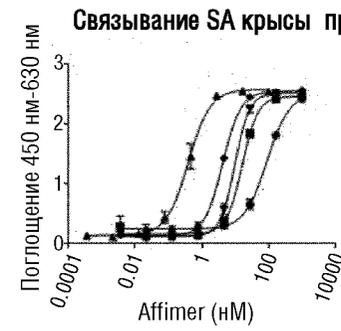
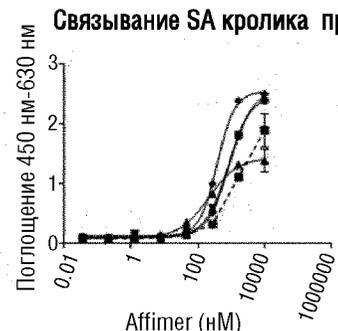
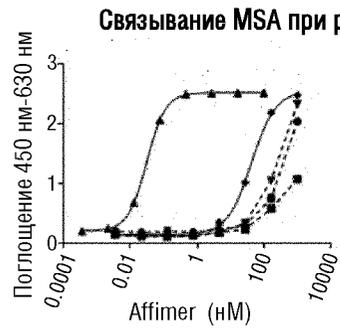
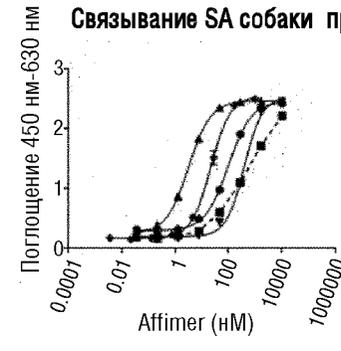
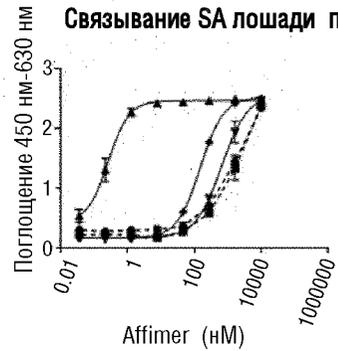
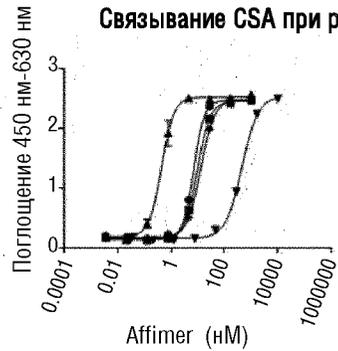
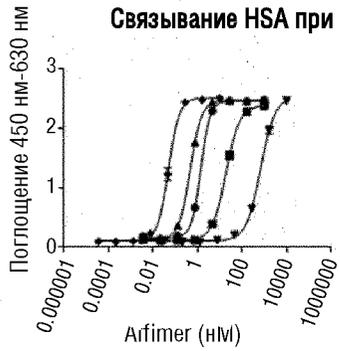


<b>KD (нМ)</b>	<b>71.5</b>
<b>Kdis (с<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.775 x 10<sup>-2</sup></b>
<b>Kon (Mc<sup>-1</sup>)</b>	<b>2.483 x 10<sup>5</sup></b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9843</b>

## Фиг. 5

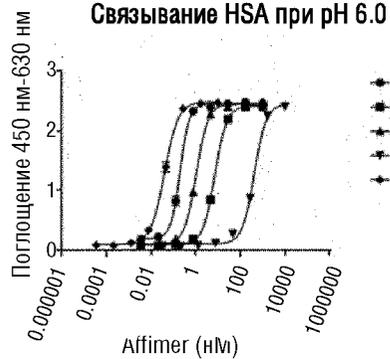


# ФИГ.6

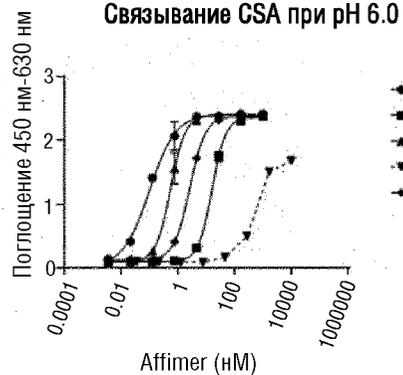


# ФИГ.7

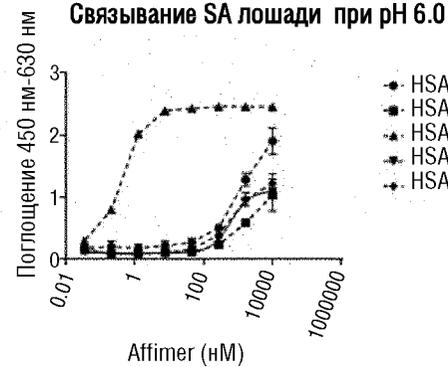
Связывание HSA при pH 6.0



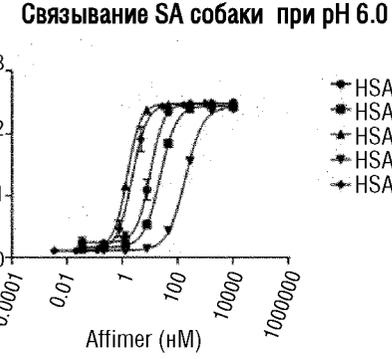
Связывание CSA при pH 6.0



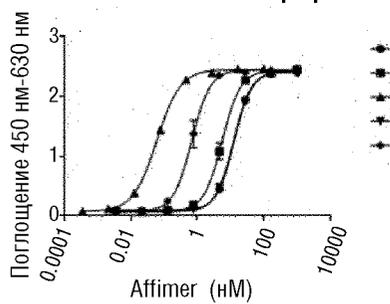
Связывание SA лошади при pH 6.0



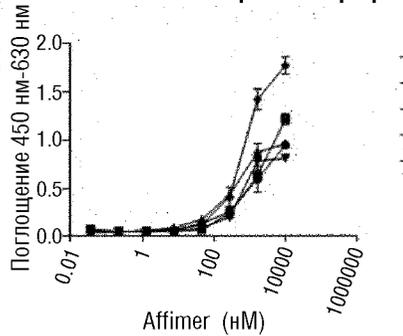
Связывание SA собаки при pH 6.0



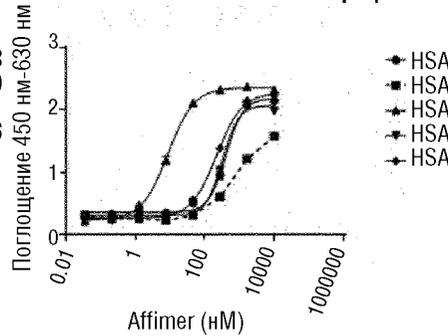
Связывание MSA при pH 6.0



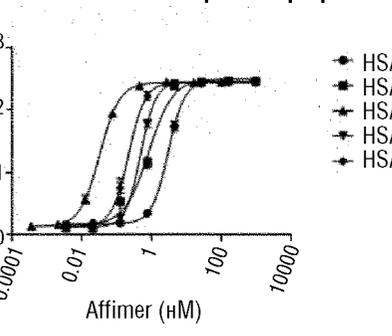
Связывание SA кролика при pH 6.0



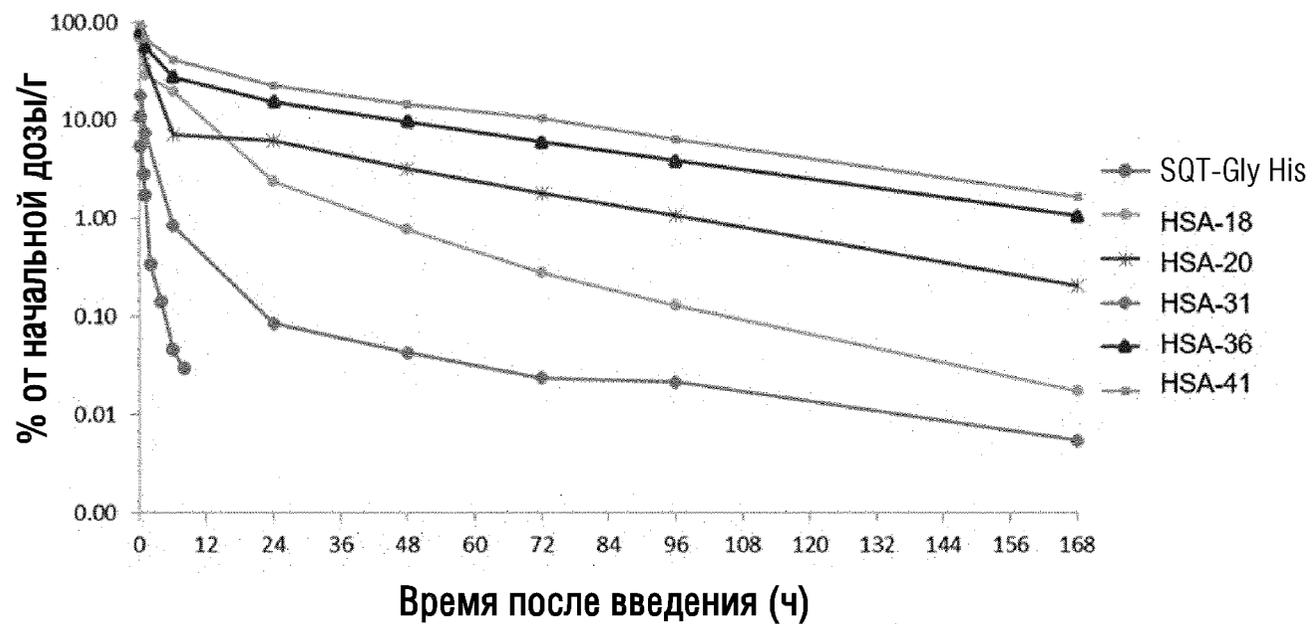
Связывание SA свиньи при pH 6.0



Связывание SA крысы при pH 6.0



ФИГ.8

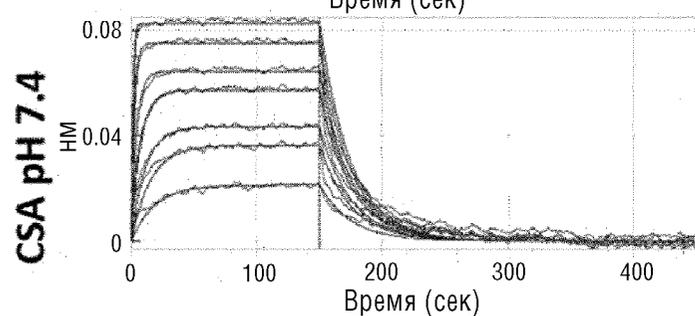
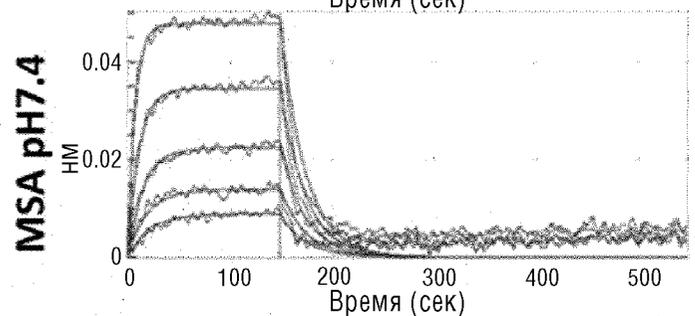
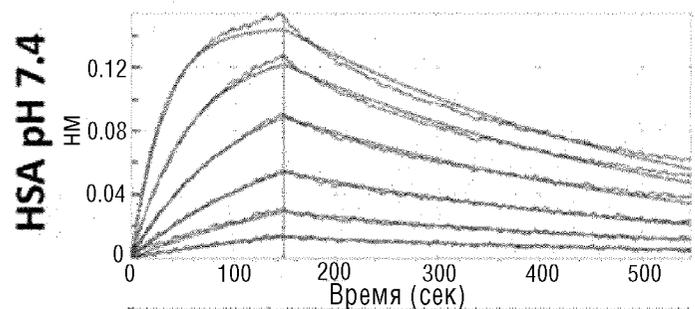


Клон	$T_{1/2}$ (ч)
SQT-Gly His	1.6
HSA-18	24.3
HSA-20	30.6
HSA-31	29.0
HSA-36	37.7
HSA-41	38.2

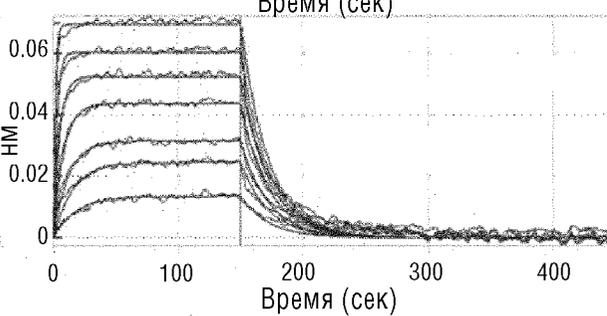
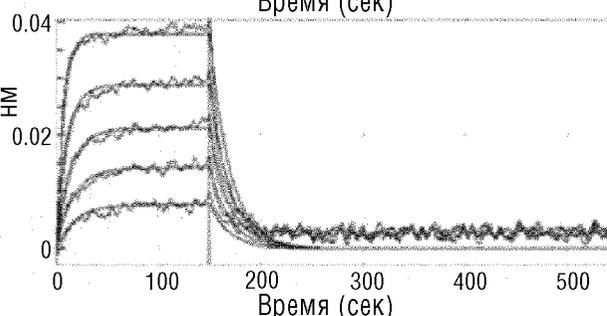
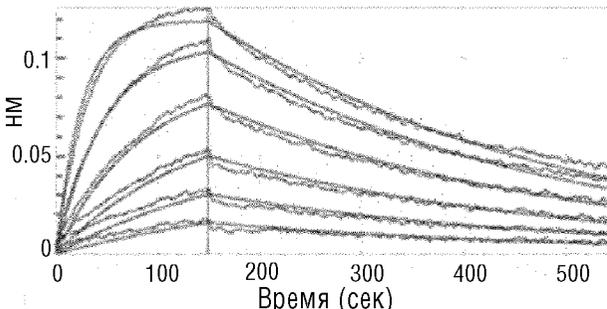
10/45

# ФИГ.9А

## HSA-41 His



## HAS-41 расщепленный

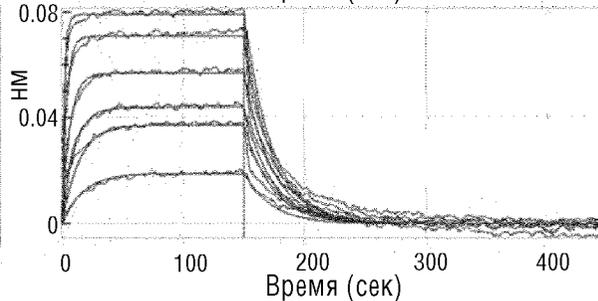
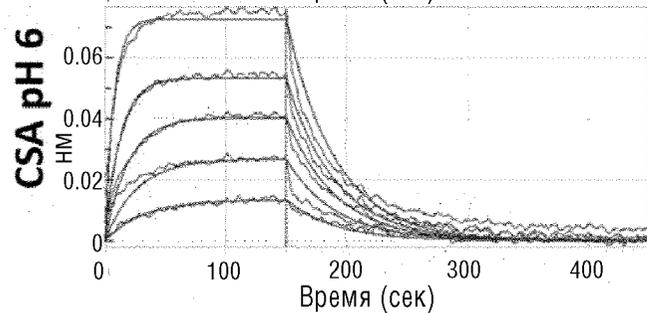
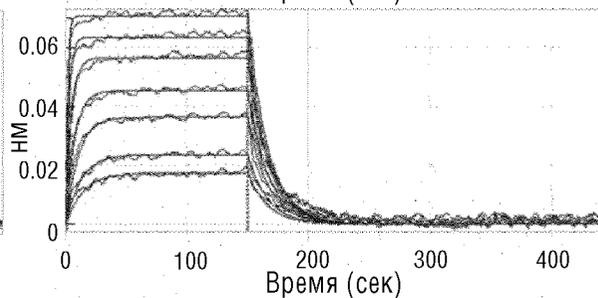
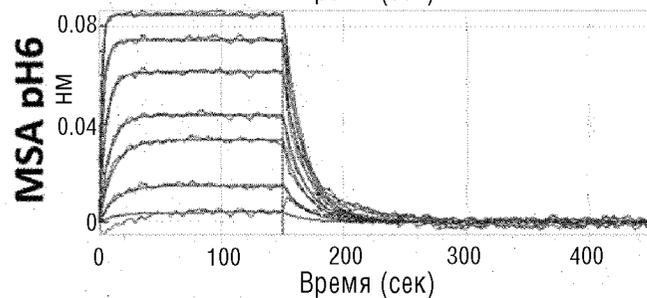
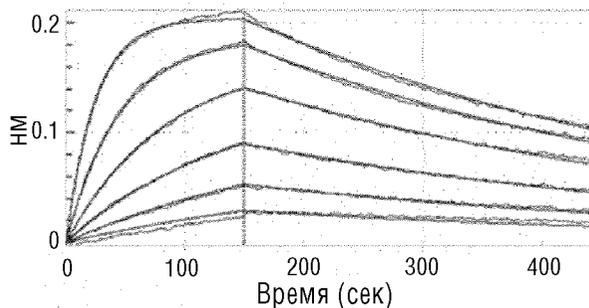
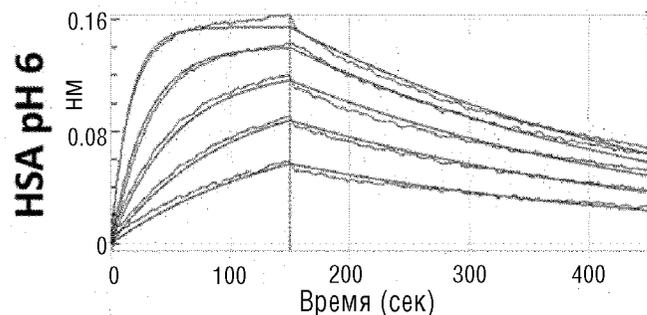


Affimer	HSA pH 7.4 K <sub>D</sub> нМ	R <sup>2</sup>
HAS-41 His-меченный	7.74	0.997
HAS-41 с отщепл. меткой	7.65	0.991
Affimer	MSA pH 7.4 K <sub>D</sub> нМ	R <sup>2</sup>
HAS-41 His-меченный	82.05	0.923
HAS-41 с отщепл. меткой	104	0.943
Affimer	CSA pH 7.4 K <sub>D</sub> нМ	R <sup>2</sup>
HAS-41 His-меченный	208.6	0.993
HAS-41 с отщепл. меткой	279.9	0.992

# ФИГ.9В

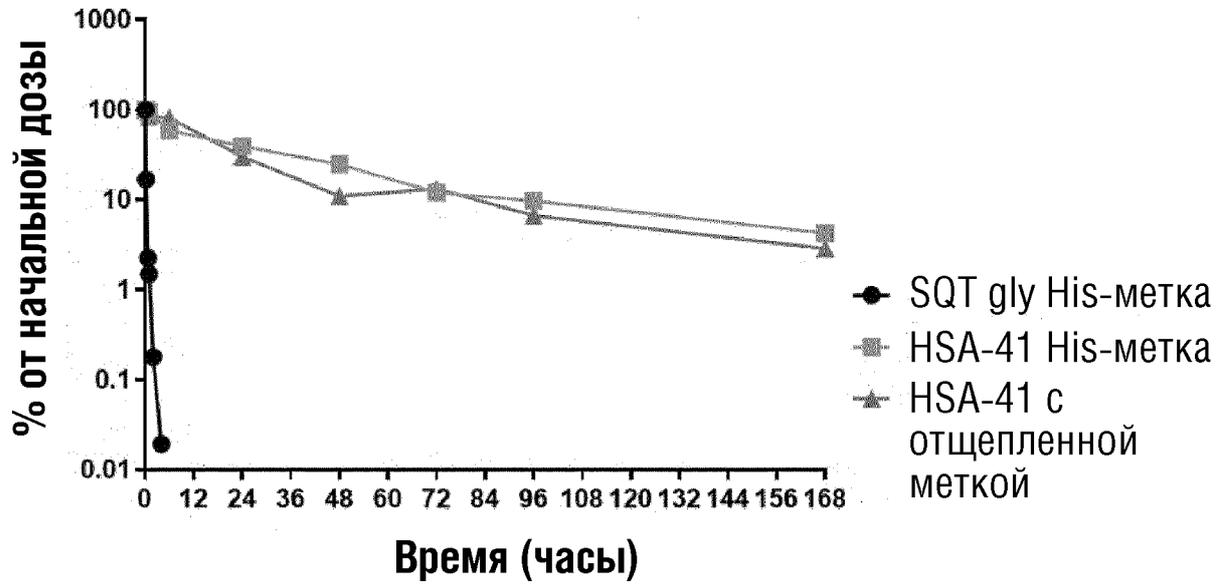
## HSA-41 His

## HAS-41 расщепленный

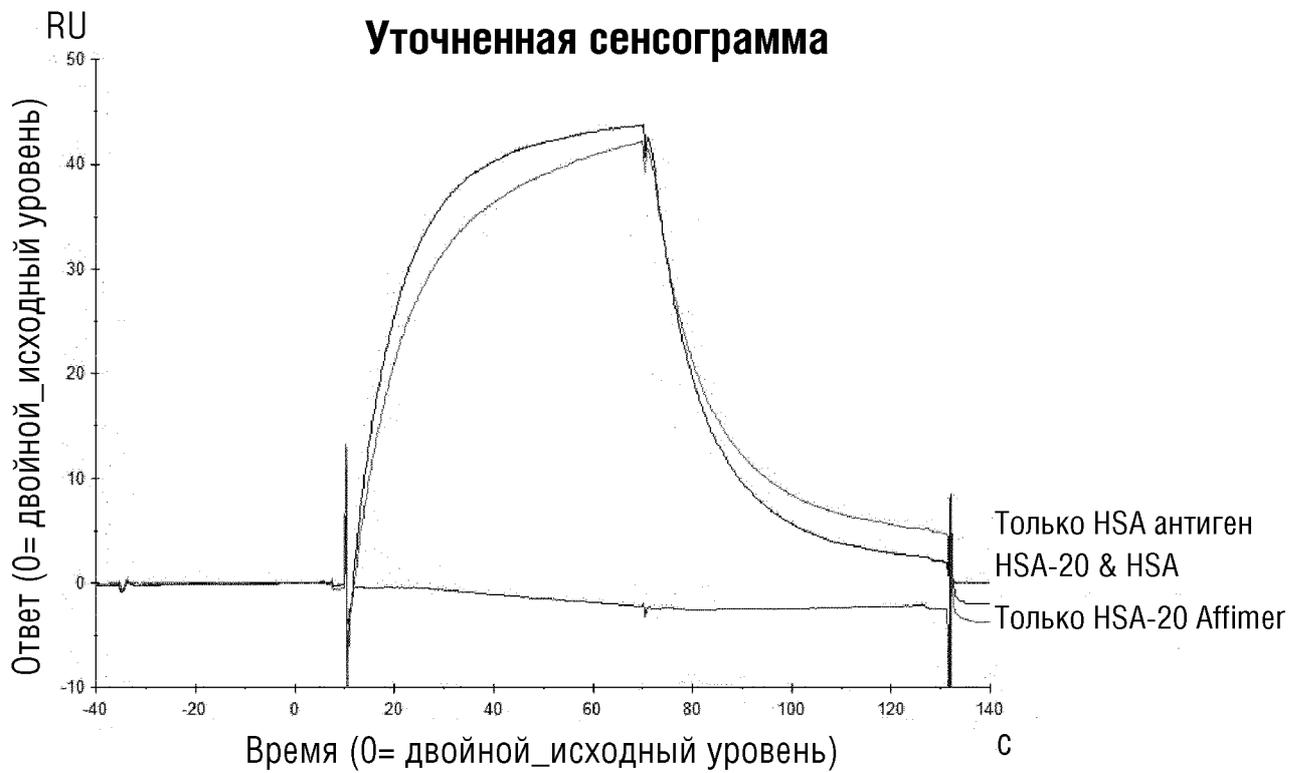


Affimer	HSA pH 6.0 $K_D$ нМ	$R^2$
HAS-41 His-меченный	11.9	0.998
HAS-41 с отщепл. меткой	4.71	0.993
Affimer	MSA pH 6.0 $K_D$ нМ	$R^2$
HAS-41 His-меченный	50.49	0.995
HAS-41 с отщепл. меткой	38.10	0.994
Affimer	CSA pH 6.0 $K_D$ нМ	$R^2$
HAS-41 His-меченный	220.2	0.986
HAS-41 с отщепл. меткой	188.9	0.991

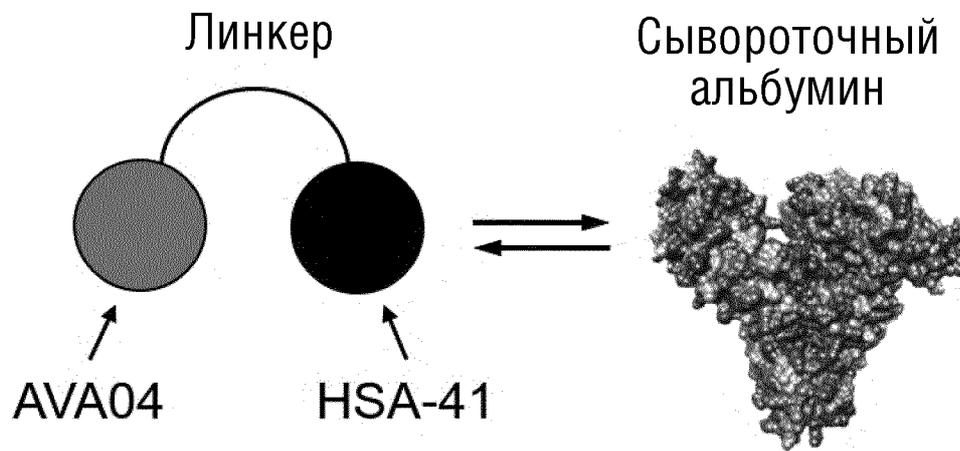
ФИГ.10



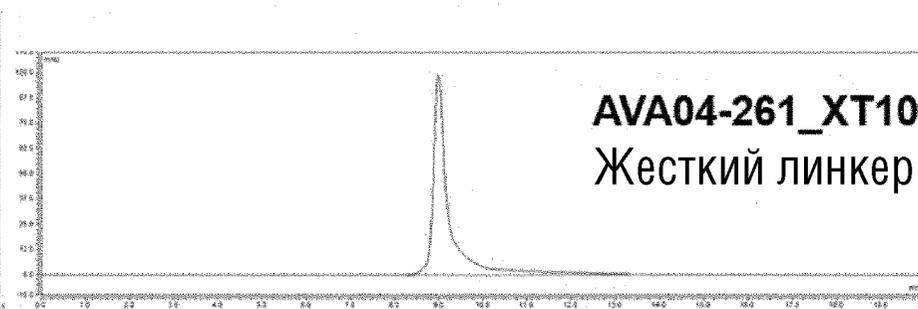
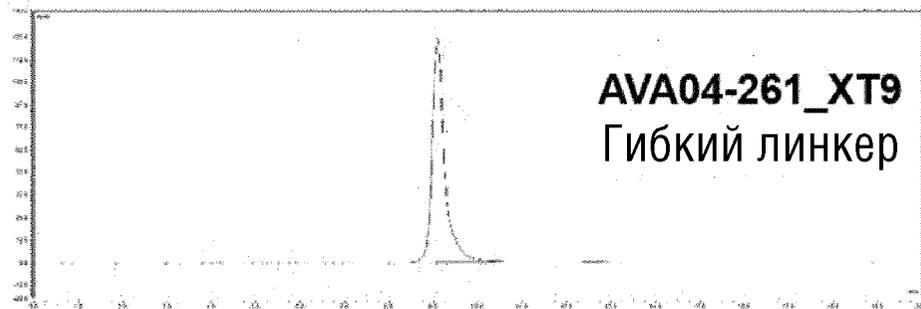
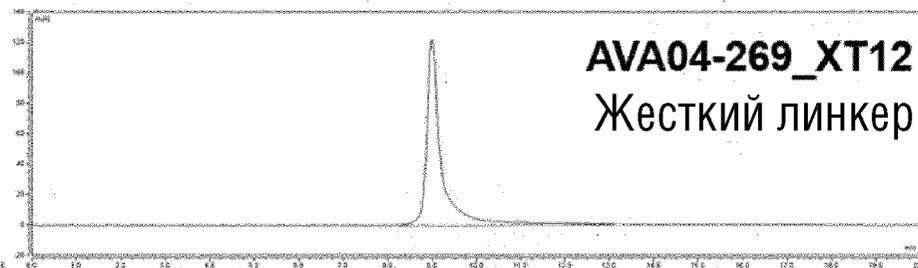
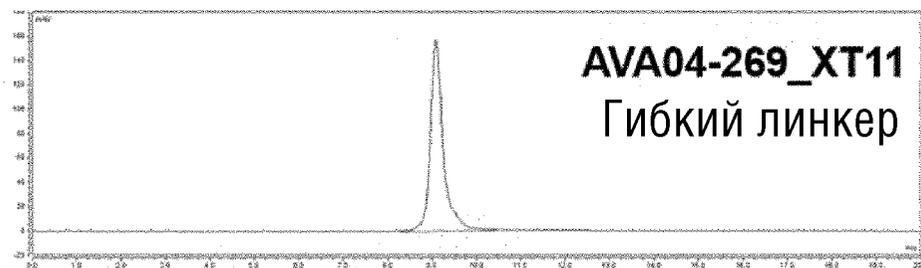
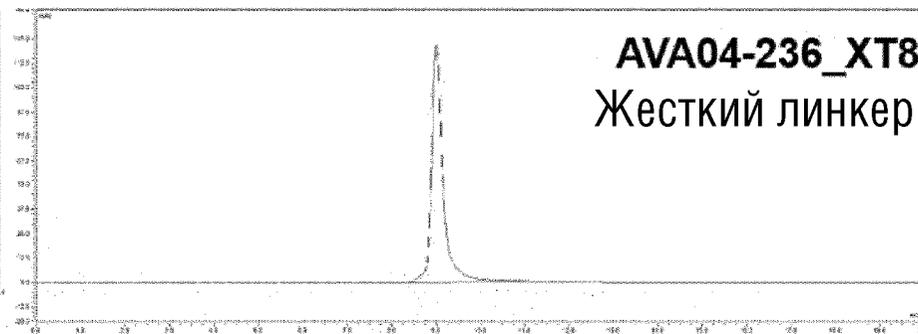
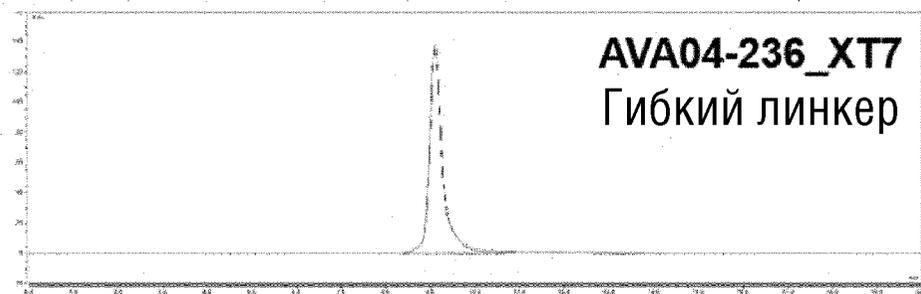
ФИГ.11



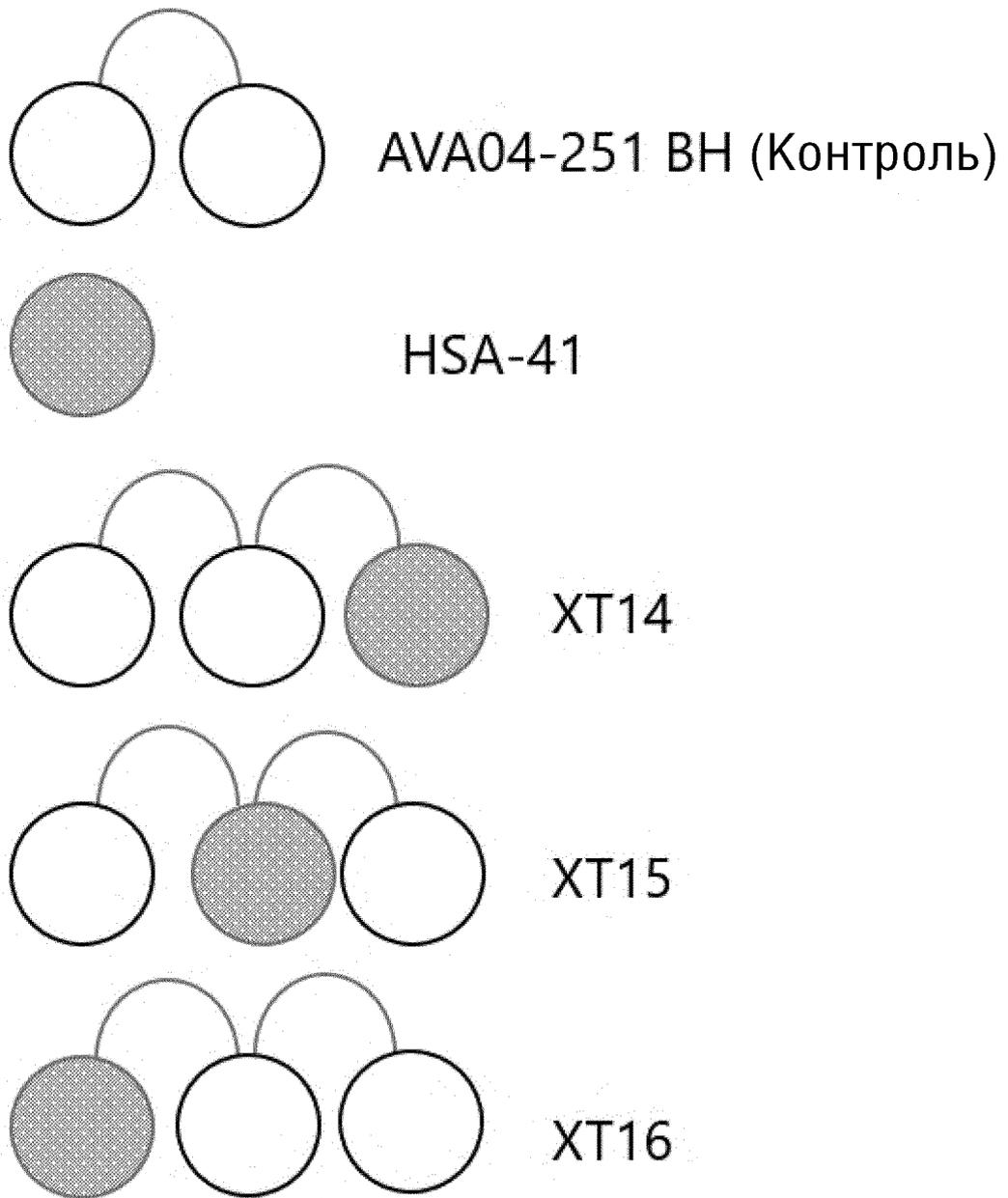
ФИГ.12А



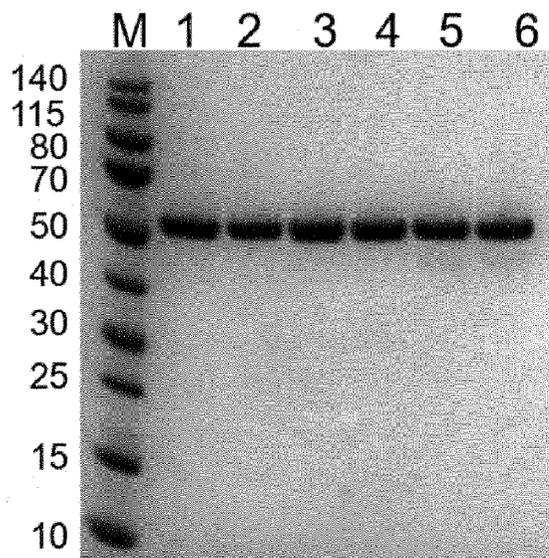
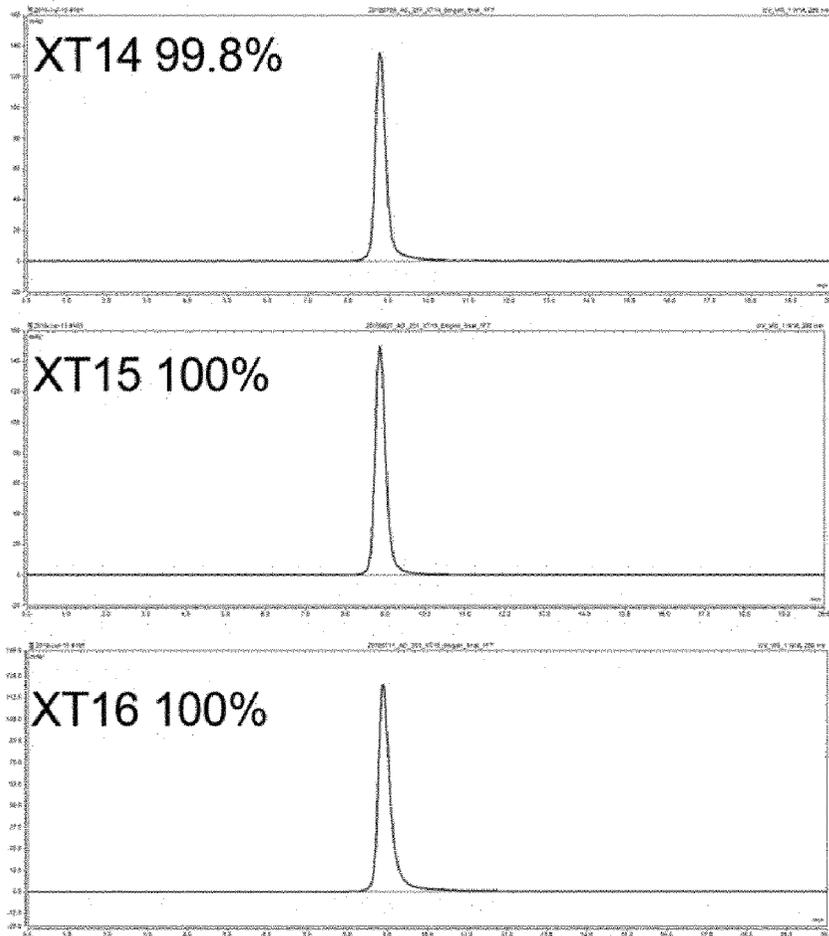
# ФИГ.12В



ФИГ.13



# ФИГ.14



Дорожка	Описание
M	Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler
1	XT14 3 мг/кг
2	XT14 6 мг/кг
3	XT15 3 мг/кг
4	XT15 6 мг/кг
5	XT16 3 мг/кг
6	XT16 6 мг/кг

17/45

# ФИГ.15

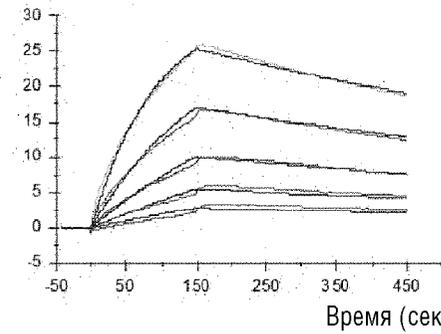
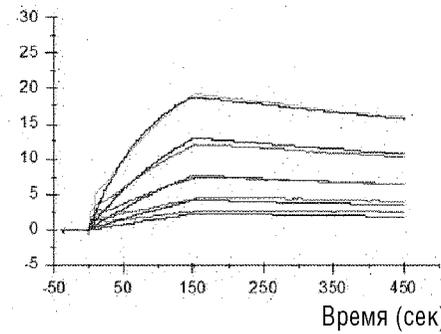
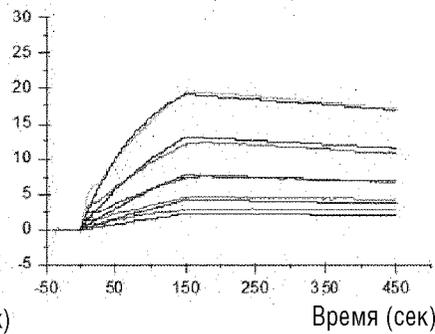
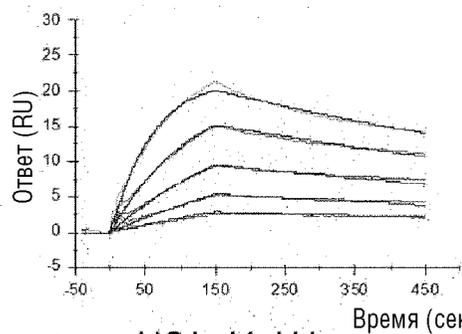
Аналит: AVA04-251 BH

AVA04-251 XT14

AVA04-251 XT15

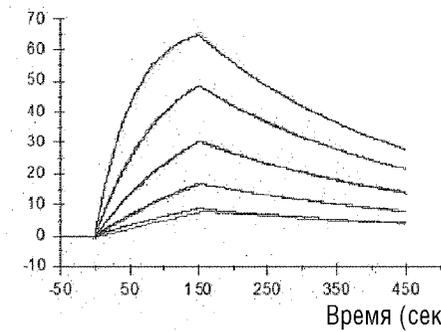
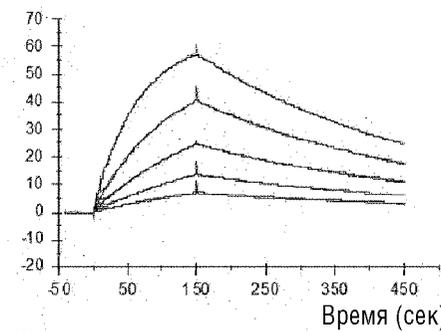
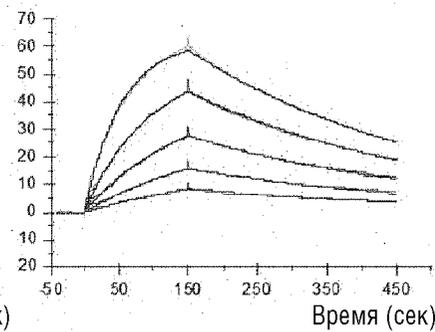
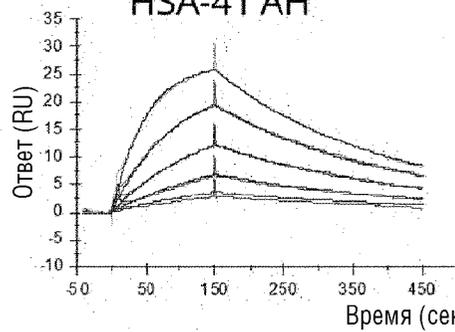
AVA04-251 XT16

лиганд: huPD-L1-Fc

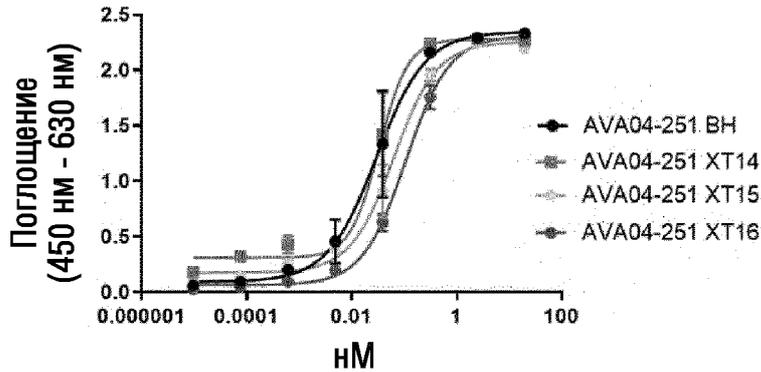


лиганд: HSA

HSA-41 AH

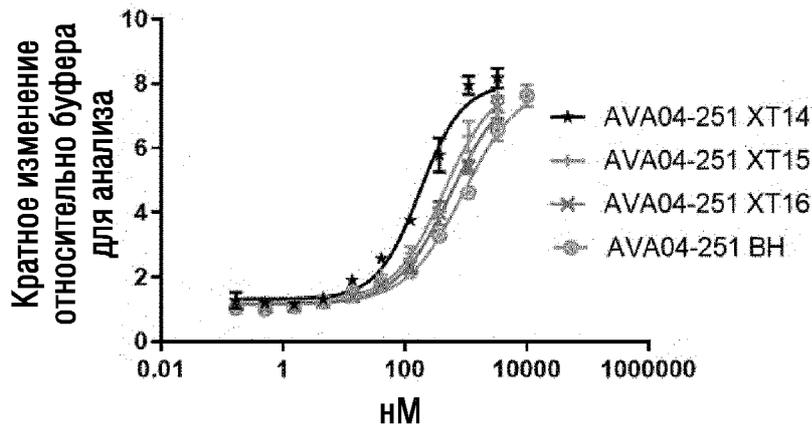


ФИГ.16



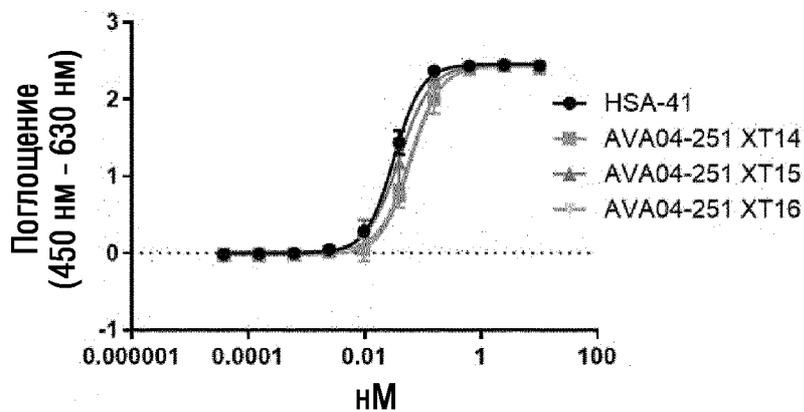
IC <sub>50</sub> (нМ)	
AVA04-251 BH	0.03
AVA04-251 XT14	0.033
AVA04-251 XT15	0.064
AVA04-251 XT16	0.11

ФИГ.17



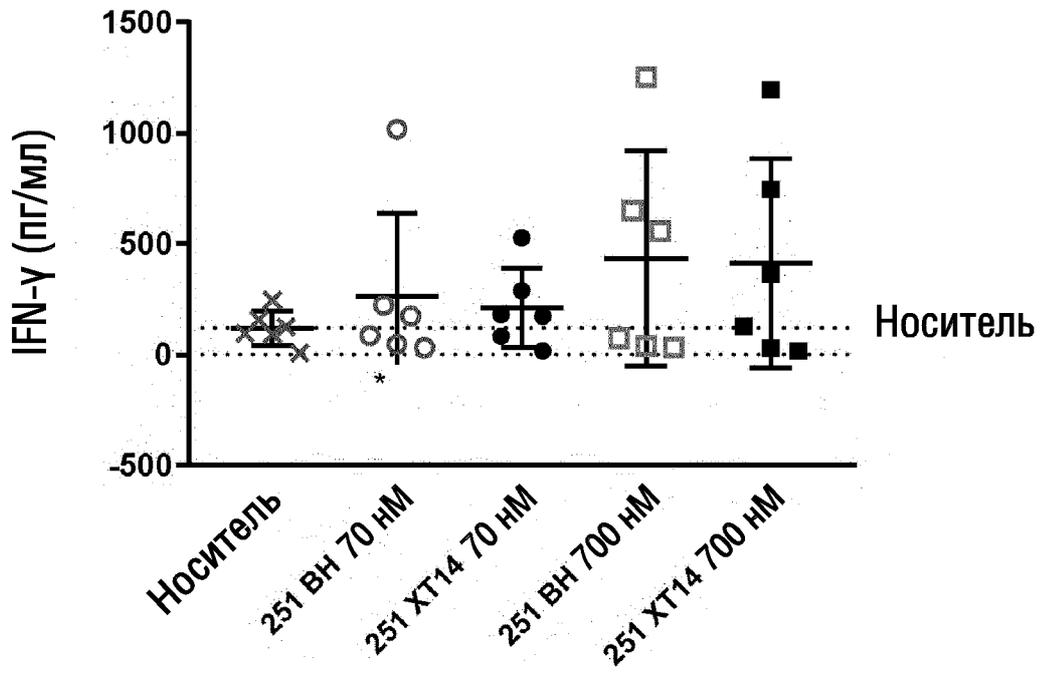
IC <sub>50</sub> (нМ)	
AVA04-251 BH	893
AVA04-251 XT14	176
AVA04-251 XT15	434
AVA04-251 XT16	564

ФИГ.18

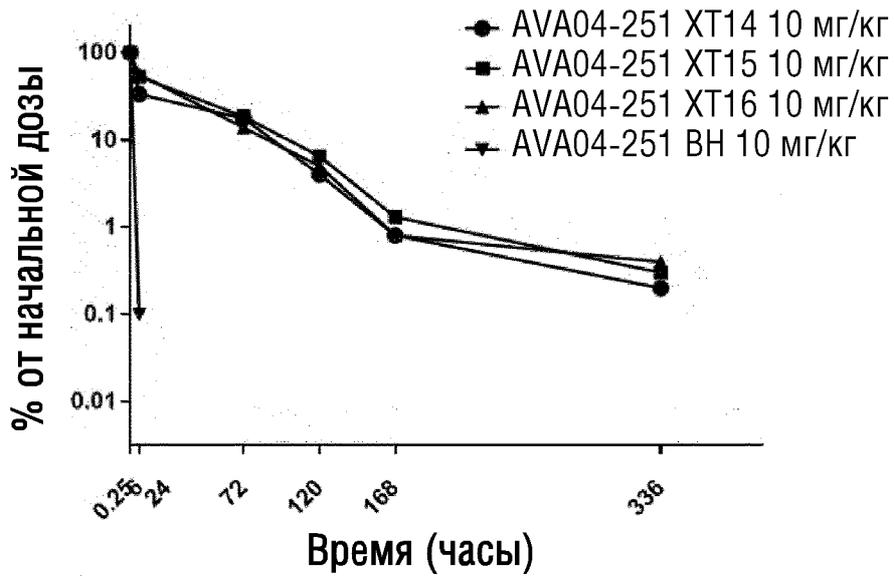


EC <sub>50</sub> (нМ) pH 7.4	
HSA-41	0.04
AVA04-251 XT14	0.062
AVA04-251 XT15	0.039
AVA04-251 XT16	0.059

ФИГ.19



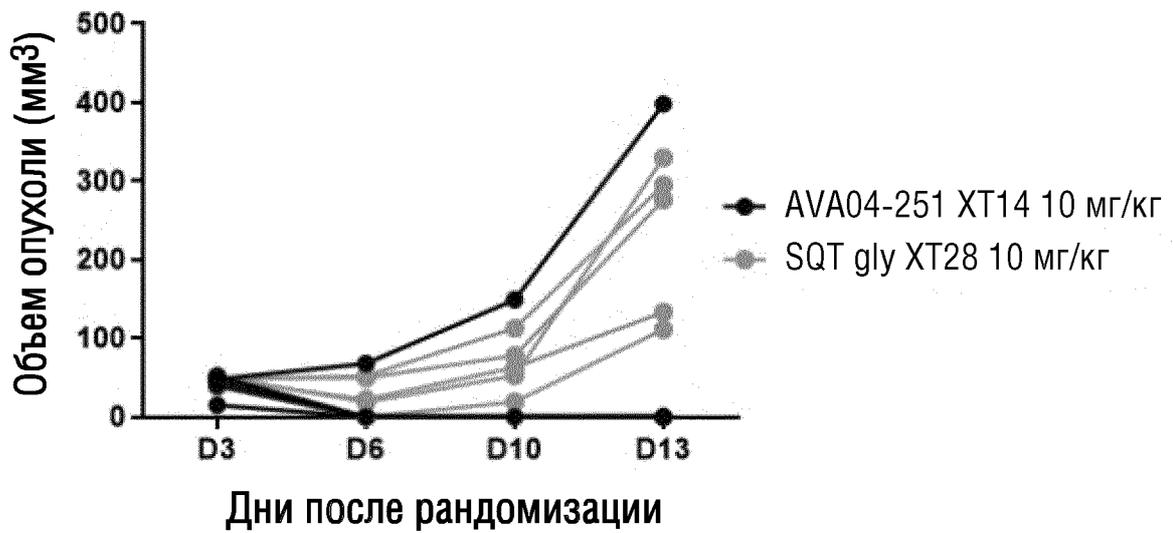
ФИГ.20



Время полужизни $t_{1/2}$	AVA04-251 BH	AVA04-251 XT14	AVA04-251 XT15	AVA04-251 XT16
Среднее (ч)	3.2	23.8	24.19	24.22

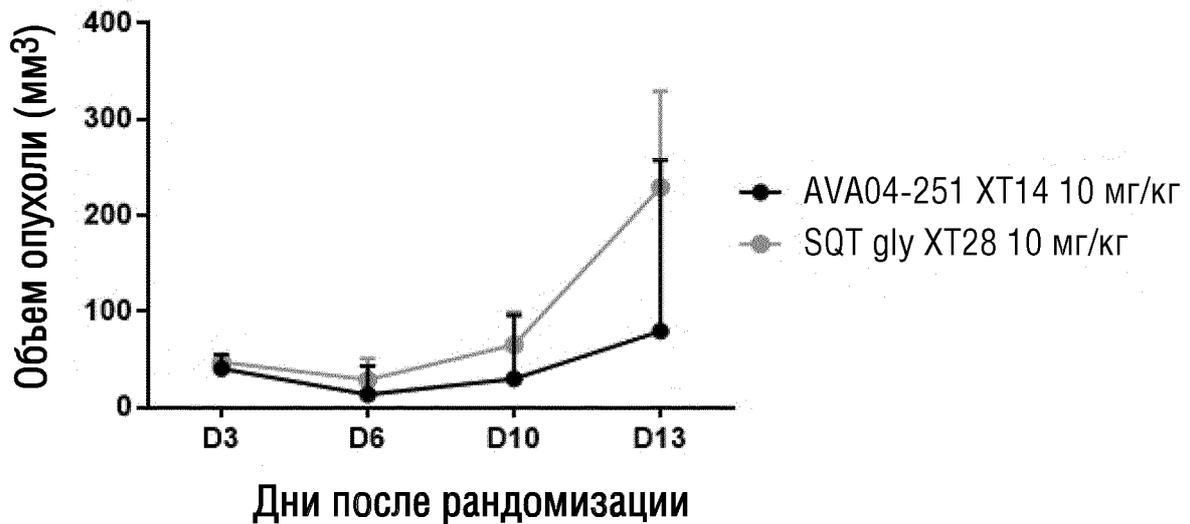
ФИГ.21А

Модель ксенотрансплантата, очищенные CD3+

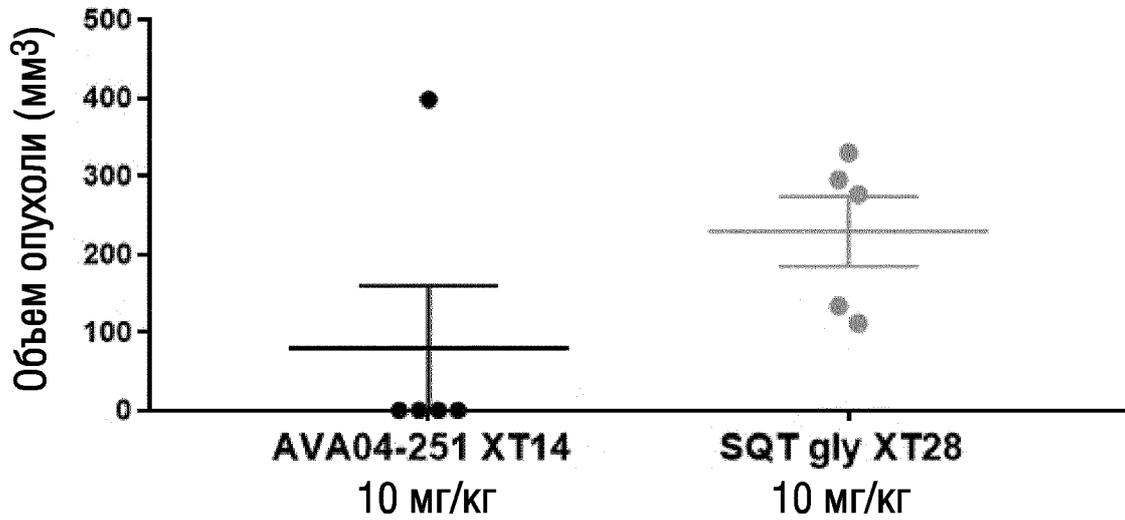


ФИГ.21В

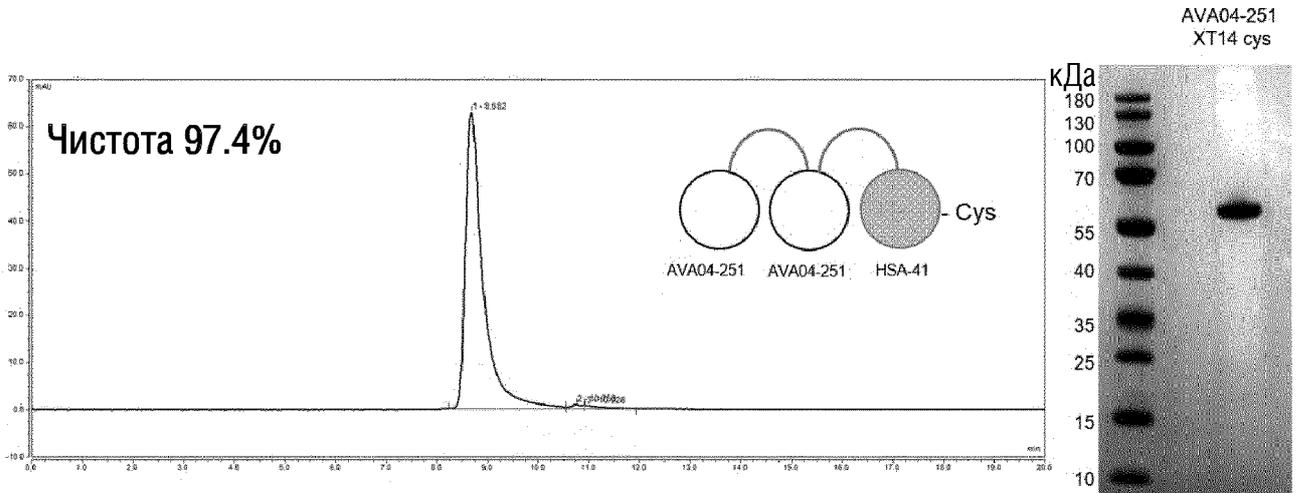
Модель ксенотрансплантата, очищенные CD3+



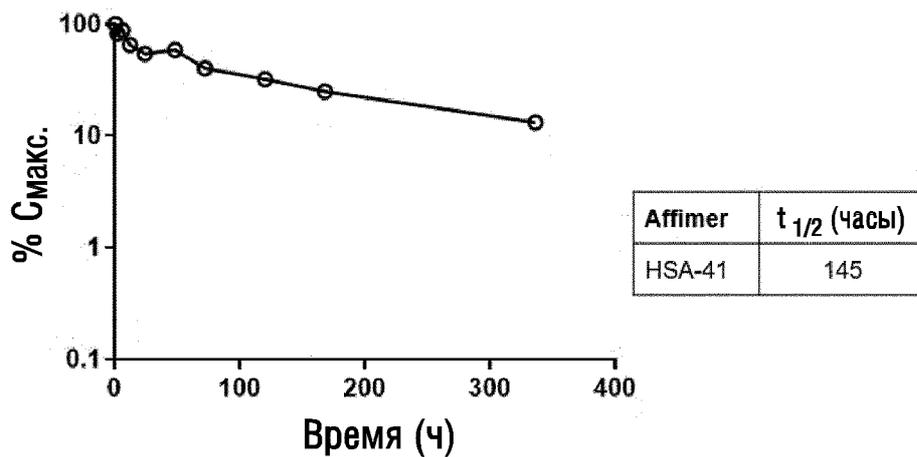
ФИГ.21С



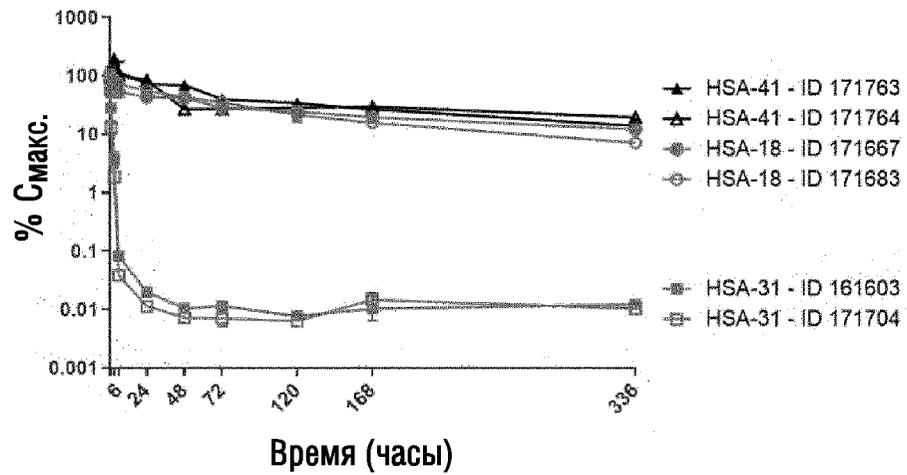
ФИГ.22



ФИГ.23

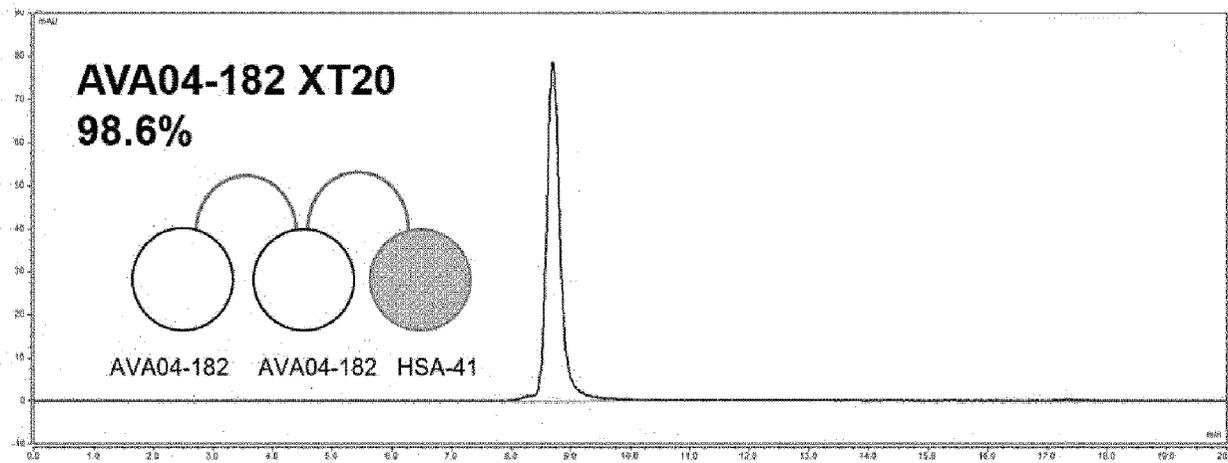


ФИГ.24



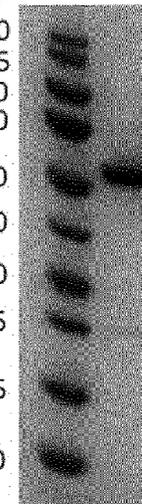
Affimer	ID животного	$t_{1/2}$ (ч)*
HSA-41	171763	134.8
	171764	183.2
HSA-18	171667	160
	171683	127.7
HSA-31	161603	6.9
	171704	0.59

ФИГ.25

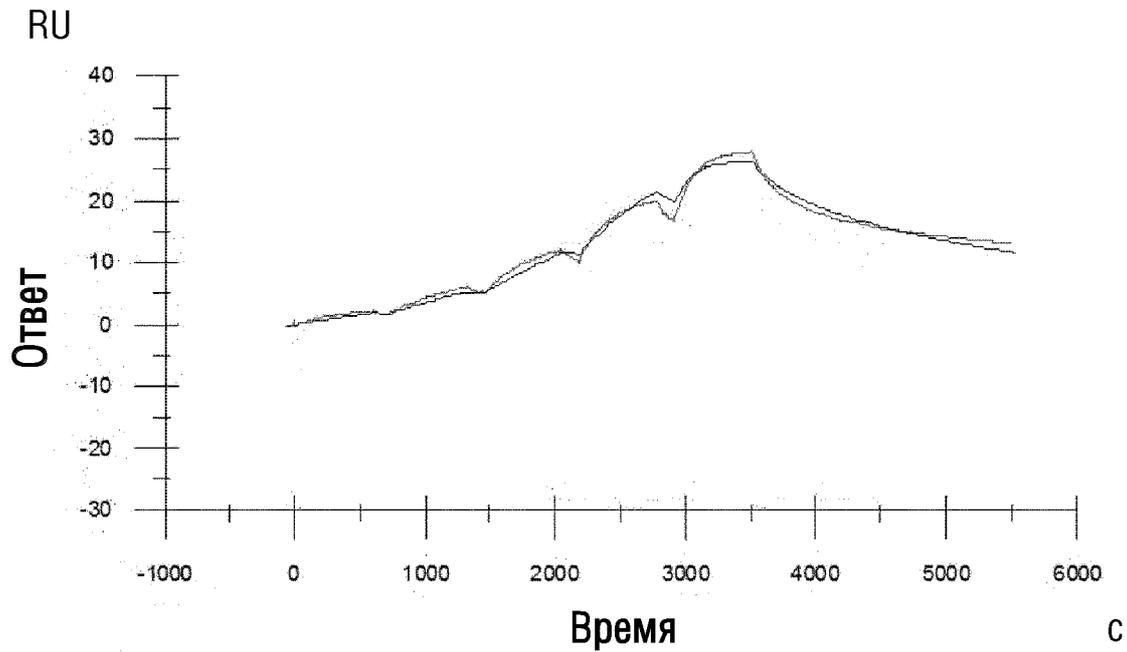


кДа

140  
115  
80  
70  
50  
40  
30  
25  
15  
10



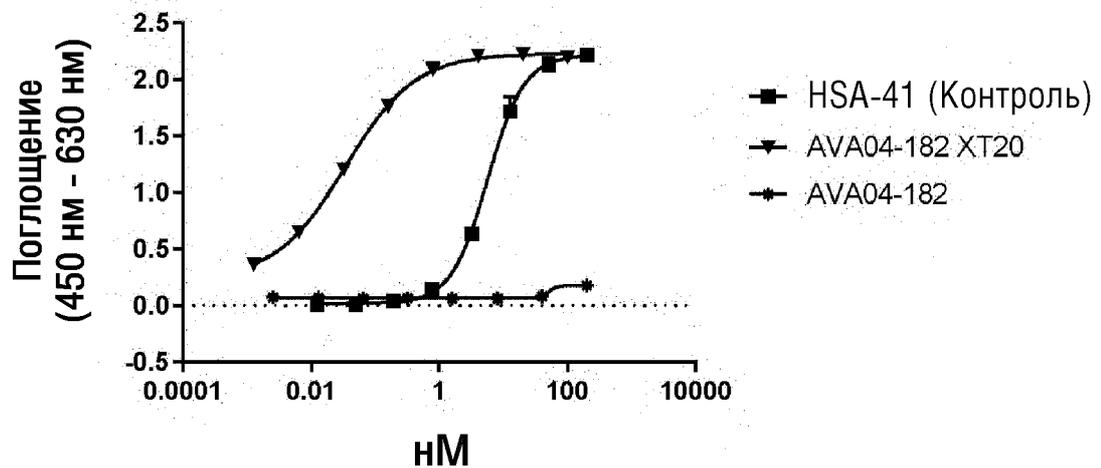
ФИГ.25В



Формат	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K <sub>D</sub> (пМ)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
AVA04-182 XT20	2.76E+07	0.002496	90.6	0.894

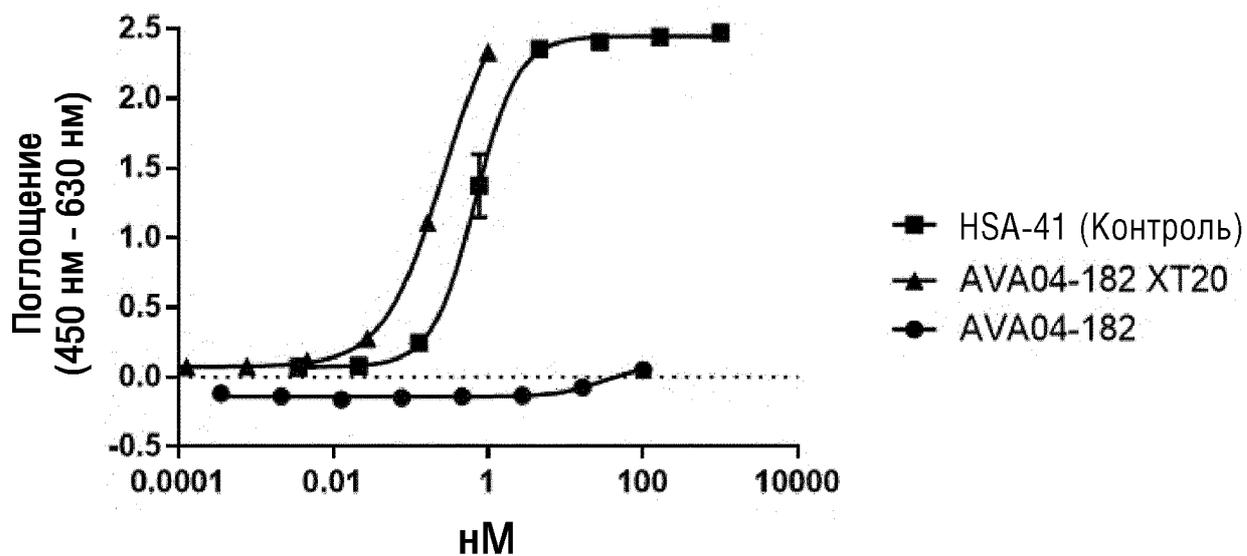
ФИГ.26А

## Связывание Affimer с MSA, pH 7



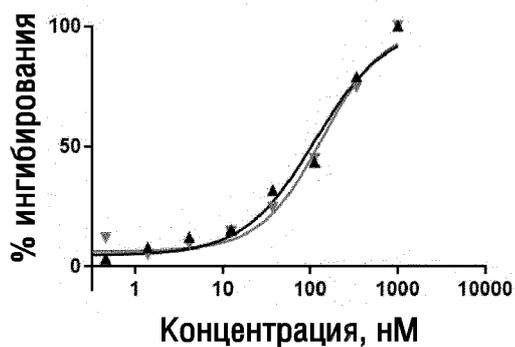
ФИГ.26В

## Связывание Affimer с MSA, pH 6.0



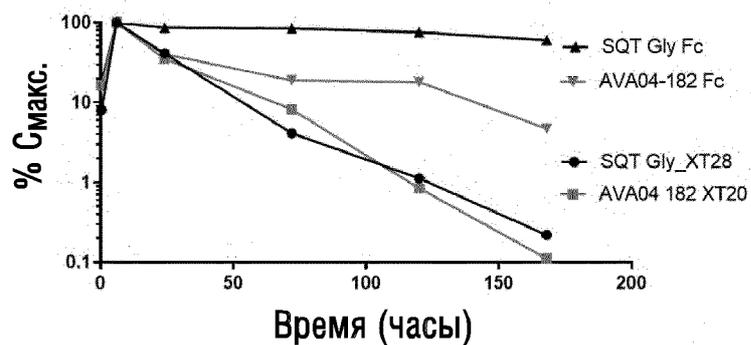
ФИГ.26С

## Конкурентный ELISA mPD-L1



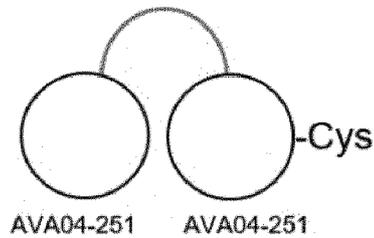
IC <sub>50</sub> (нМ)	
AVA04-182	112
AVA04-182 XT20	135

ФИГ.27

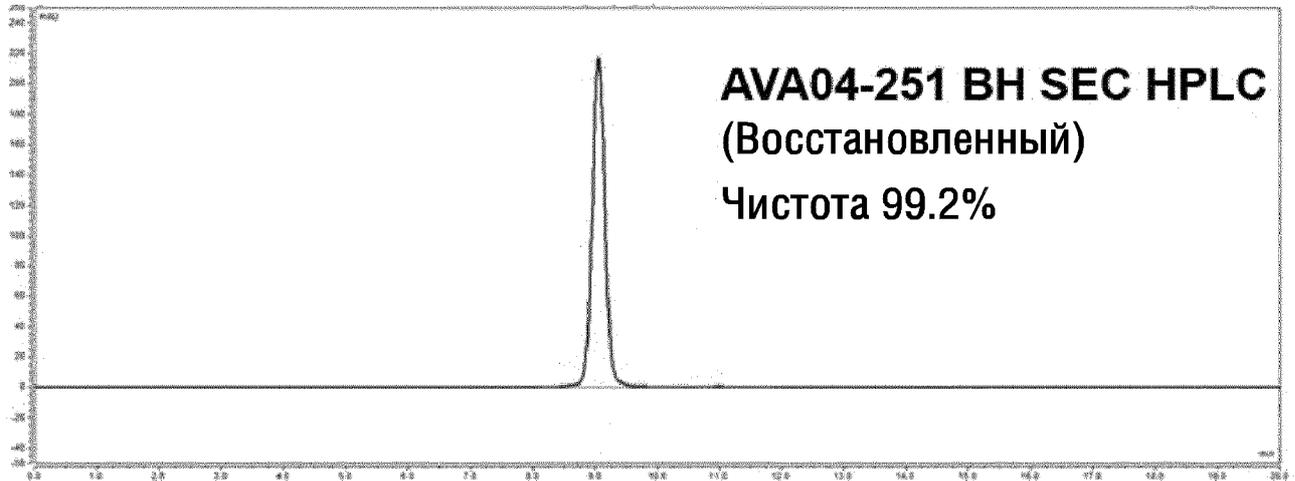


Молекула	t <sub>1/2</sub> (часы)
SQT Gly Fc	224
SQT Gly XT28	20
AVA04-182 Fc	43
AVA04-182 XT20	17

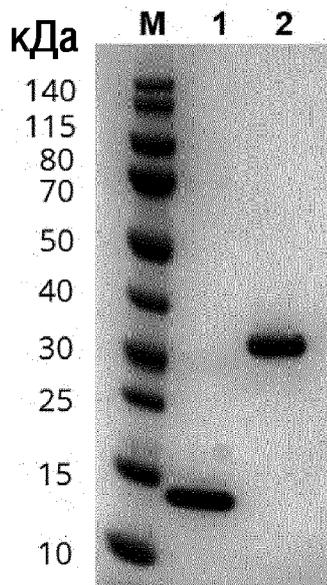
ФИГ.28А



ФИГ.28В

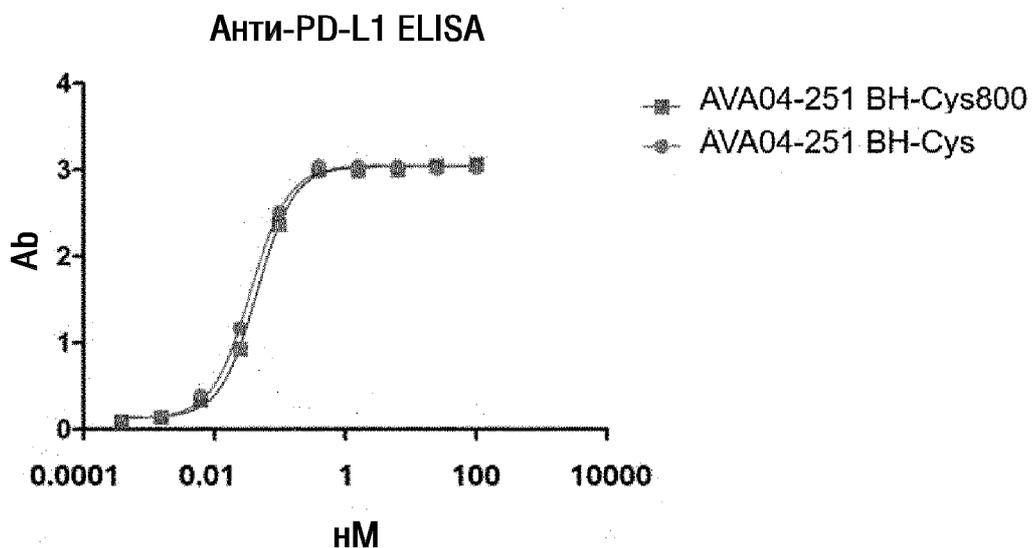


ФИГ.28С

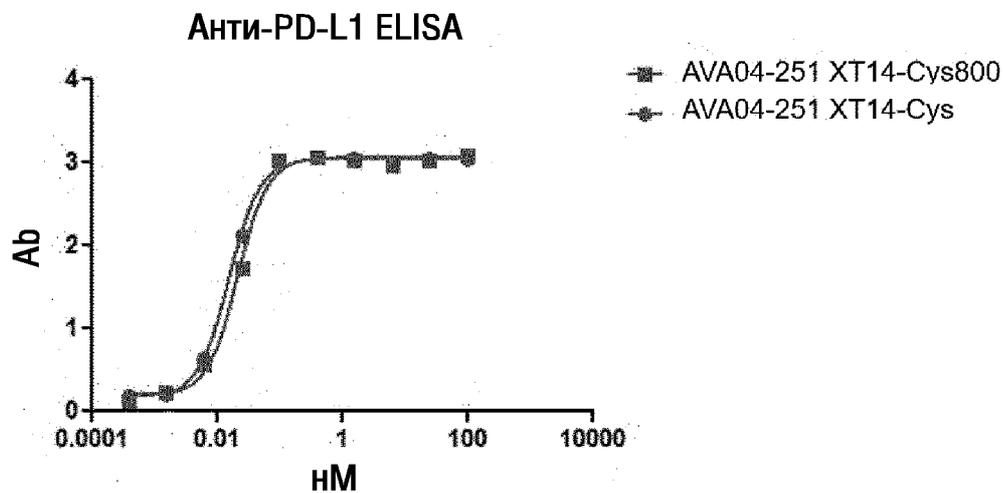


Дорожка	Описание
М	Предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler
1	SQT gly cys мономер в качестве контроля (Восстановленный)
2	AVA04-251-ВH cys димер (Восстановленный)

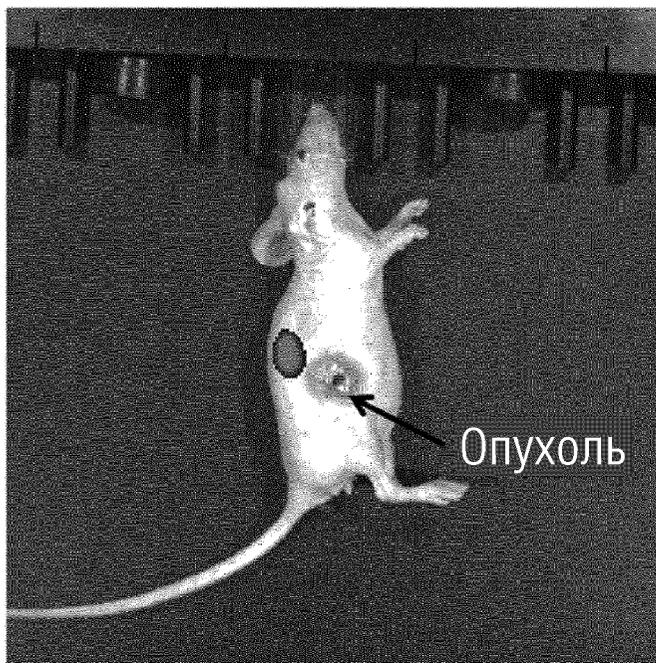
ФИГ.29А



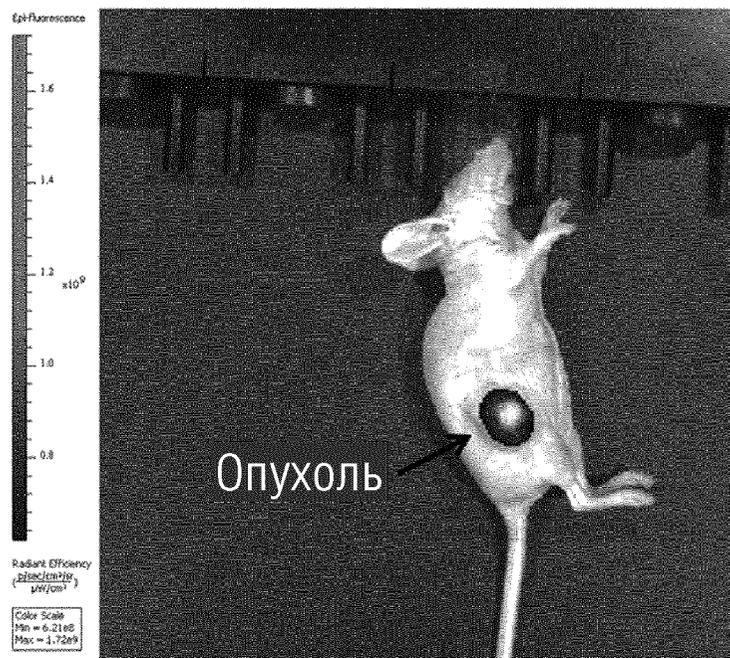
ФИГ.29В



# ФИГ.30



1 нмоль 251Вncys-800



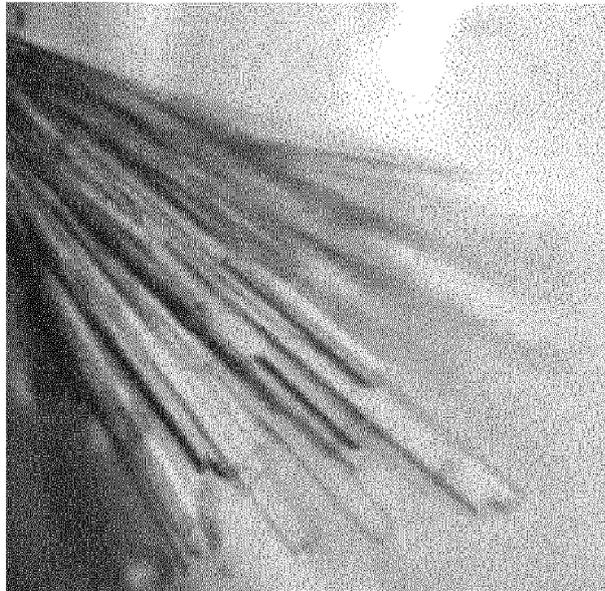
1 нмоль 251XT14cys-800



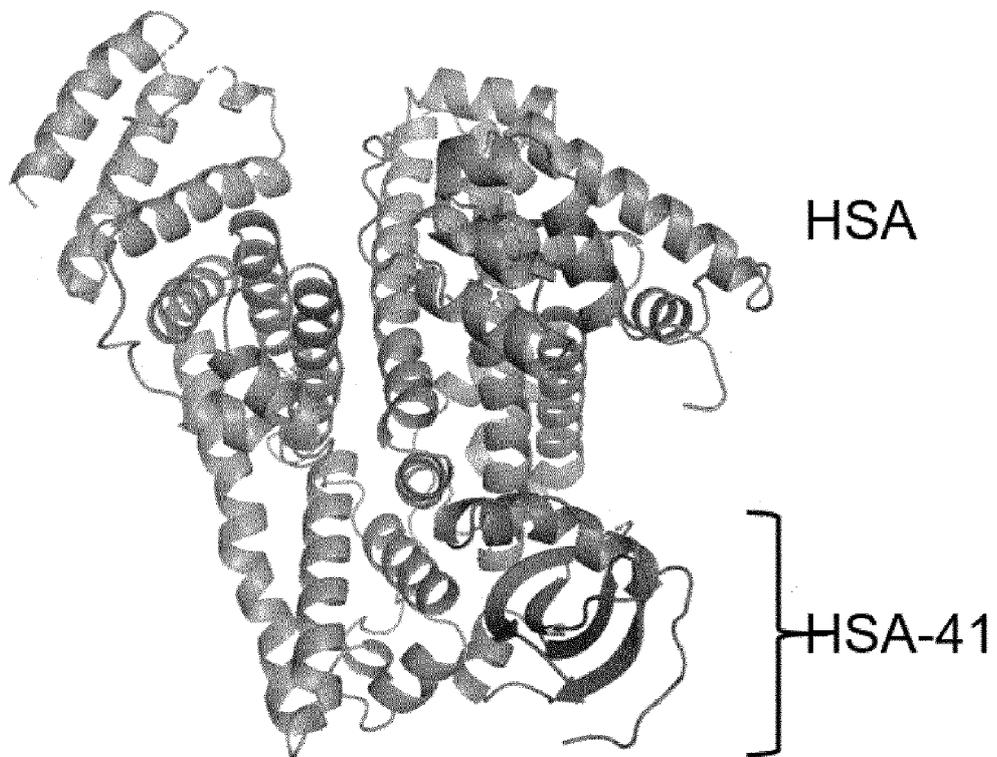
28/45

Репрезентативные данные через 4 ч

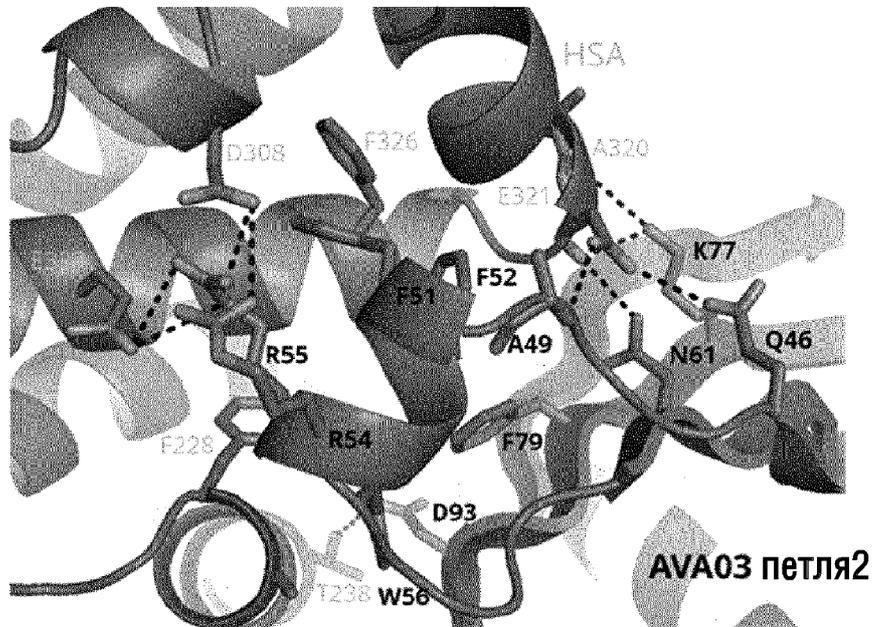
ФИГ.31А



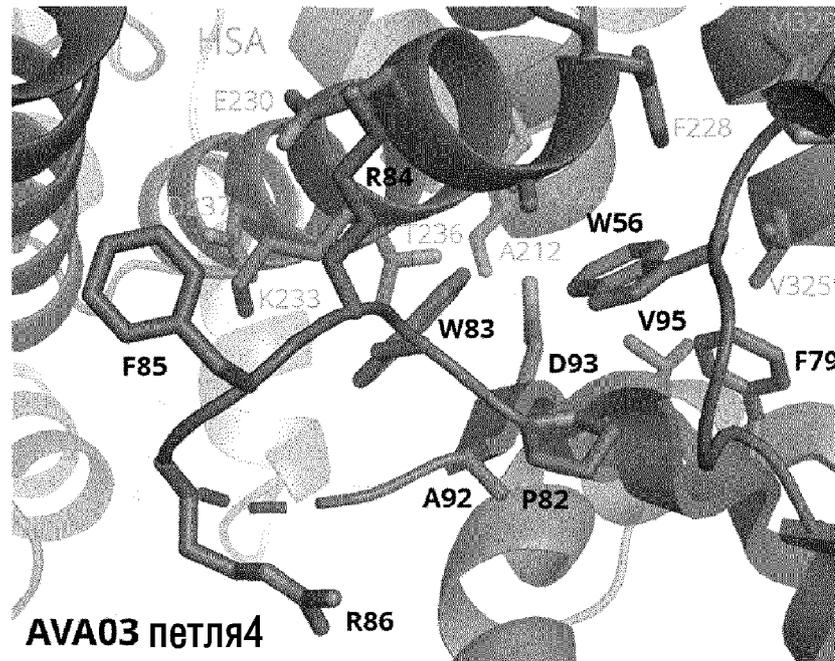
ФИГ.31В



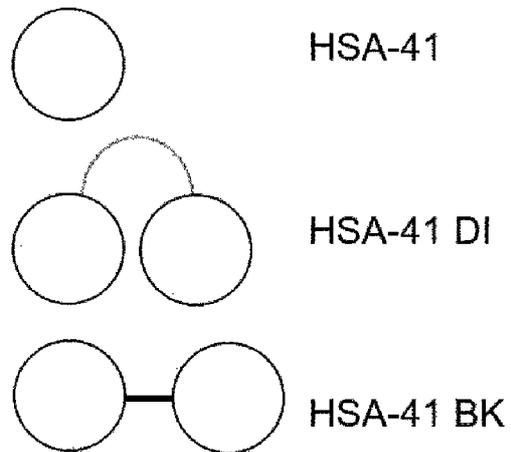
ФИГ.31С



ФИГ.31D



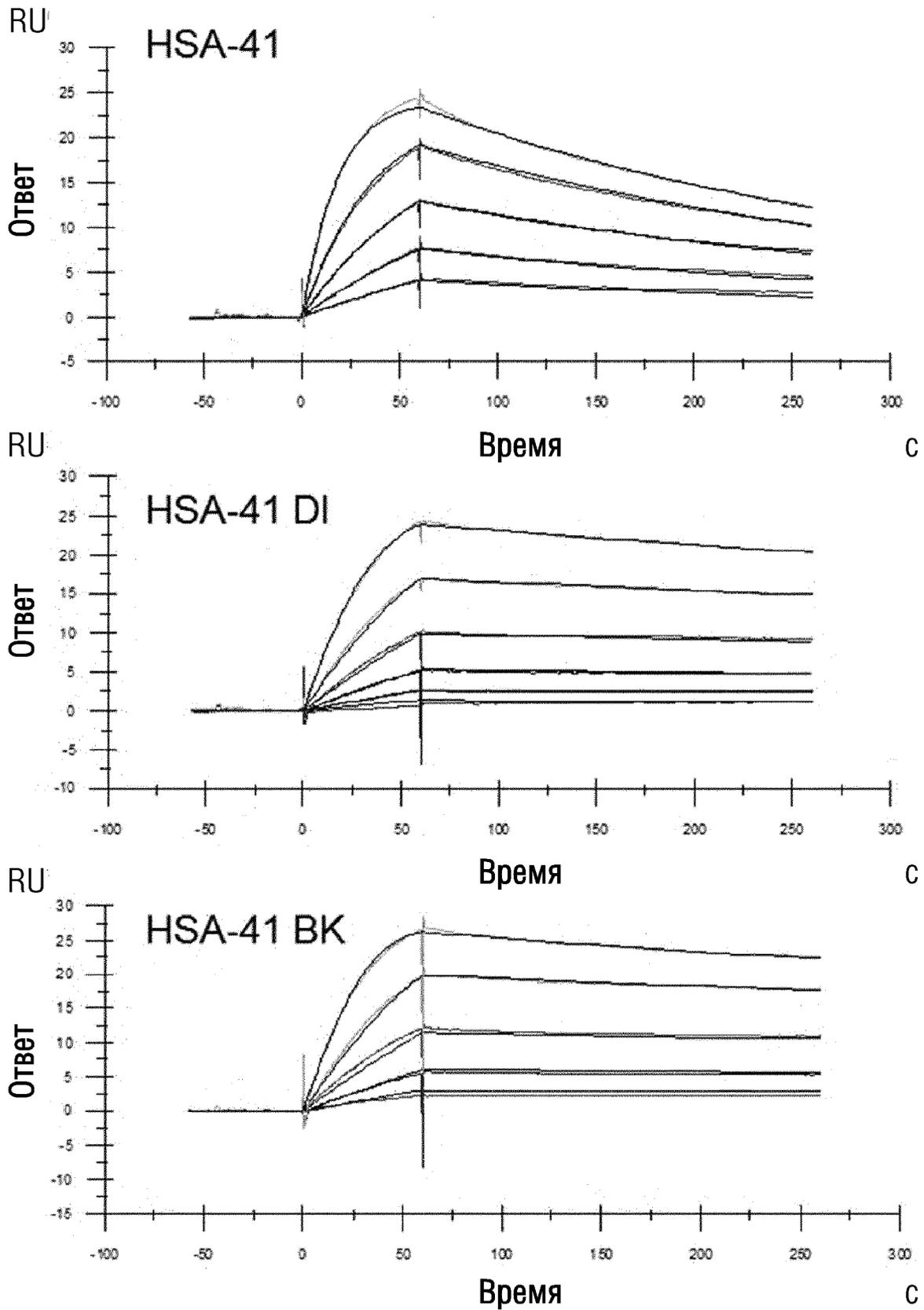
ФИГ.32А



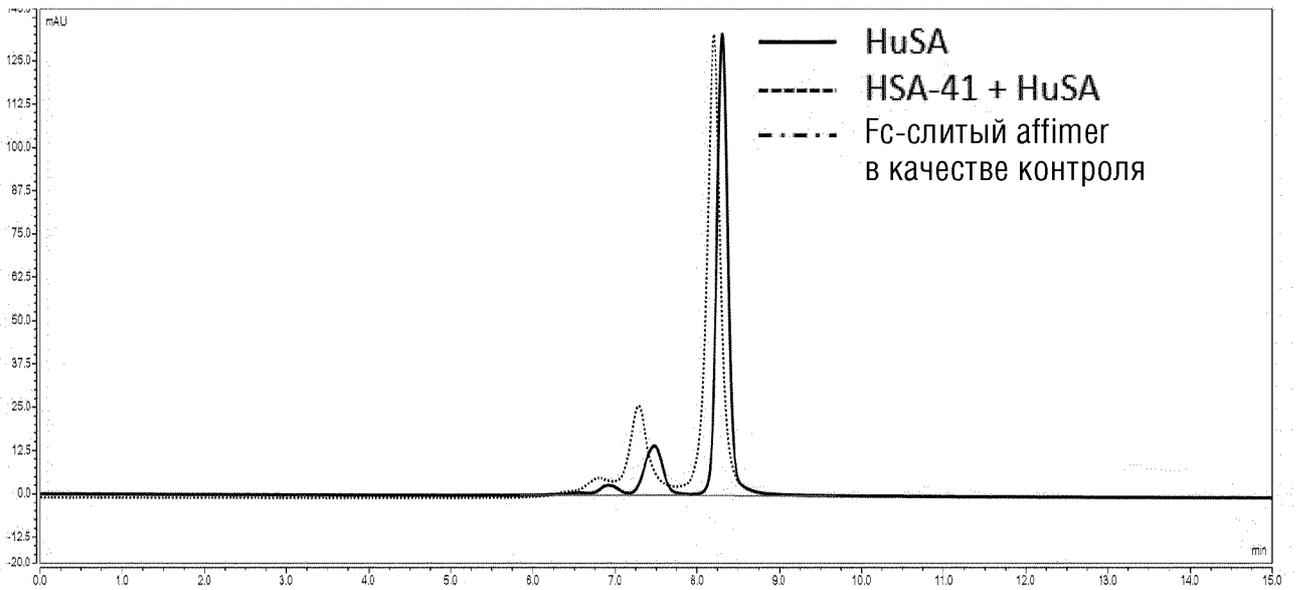
ФИГ.32В

Affimer	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
HSA-41	1.22E+06	3.47E-03	2.84E-09
HSA-41 DI	4.77E+06	9.59E-04	2.01E-10
HSA-41 BK	7.74E+06	9.94E-04	1.28E-10

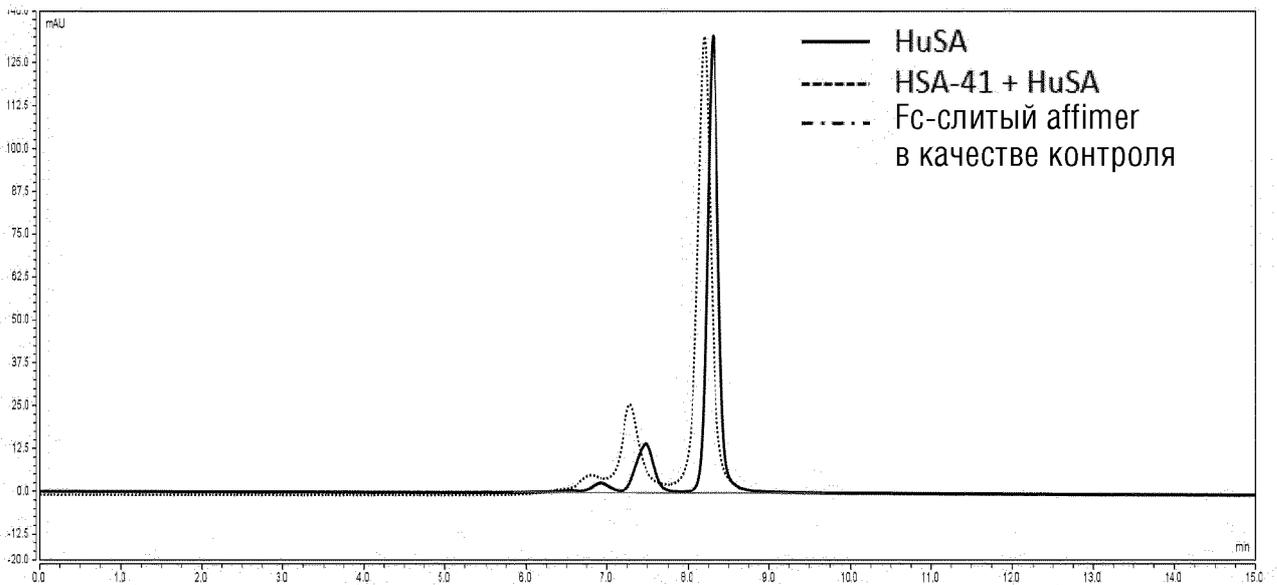
ФИГ.32С



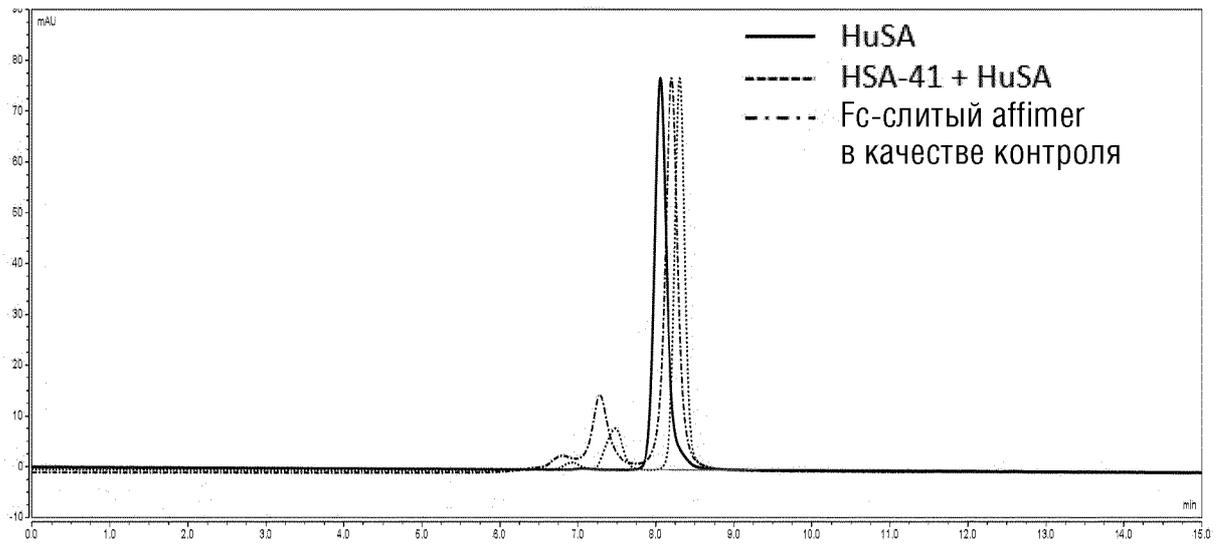
ФИГ.33А



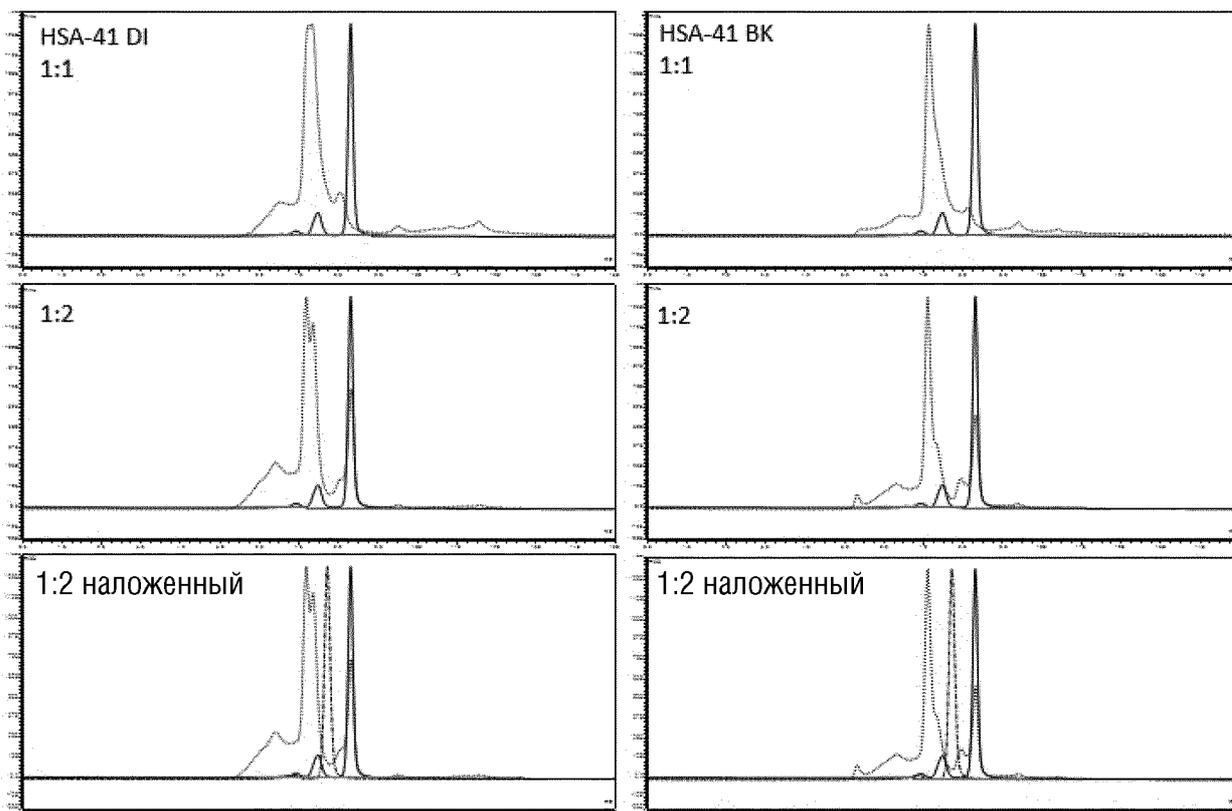
ФИГ.33В



ФИГ.33С



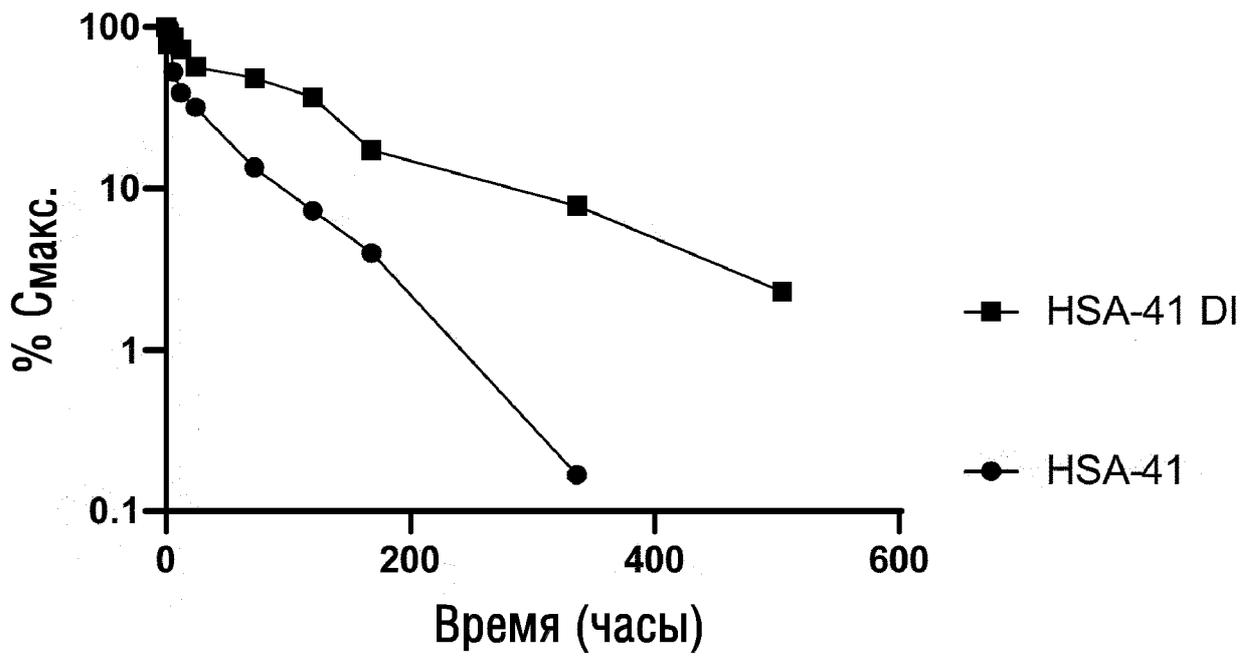
ФИГ.34



— HuSA  
 - - - HSA-41 DI/BK + HuSA  
 ····· mAb контроль

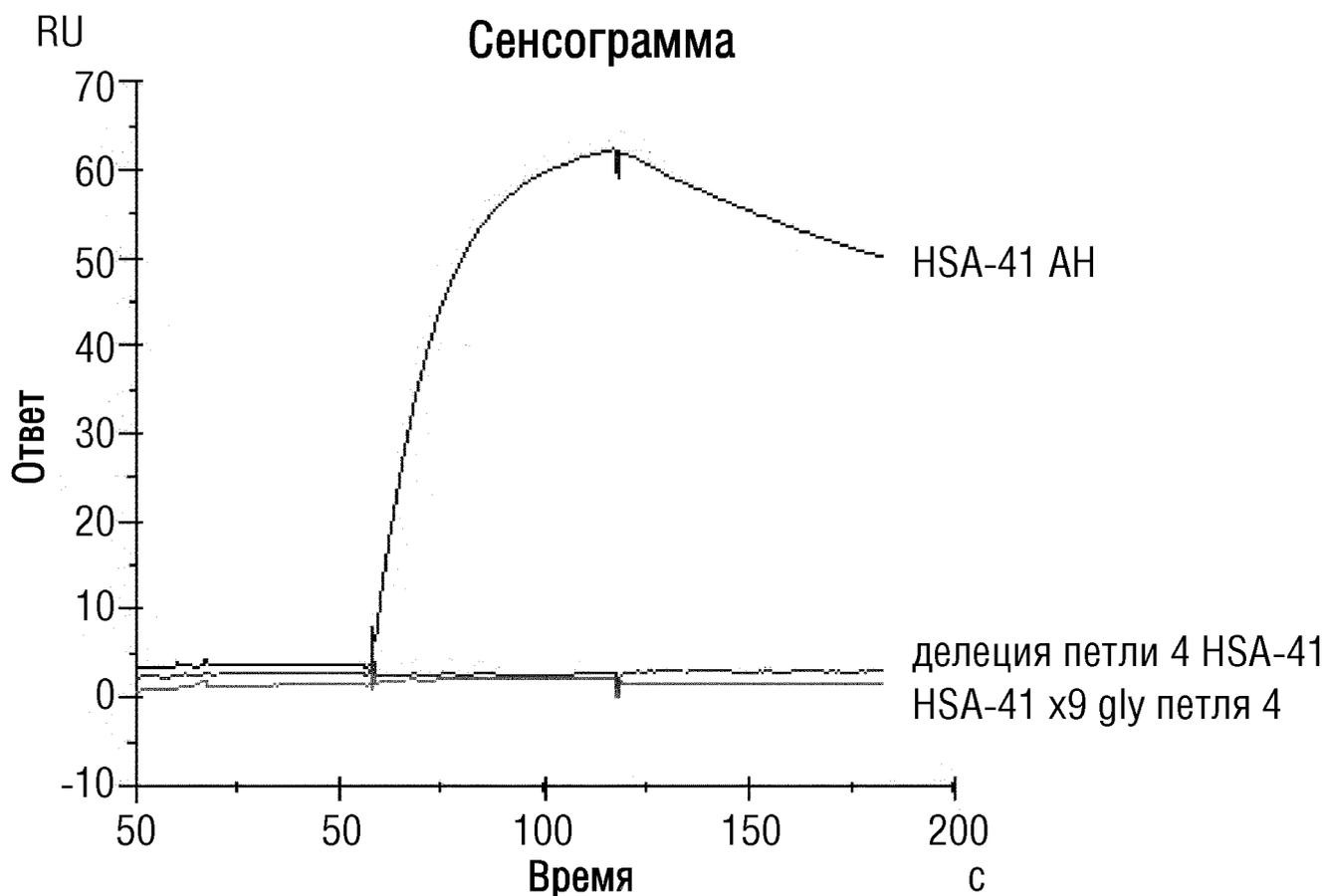
Образец	MW (кДа)
HSA-41 DI	29.9
HSA-41 DI + HuSA	96
HSA-41 DI + 2x HuSA	162
mAb контроль	150
Образец	MW (кДа)
HSA-41 BK	30.9
HSA-41 BK + HuSA	97
HSA-41 BK + 2x HuSA	163
mAb контроль	150

ФИГ.35

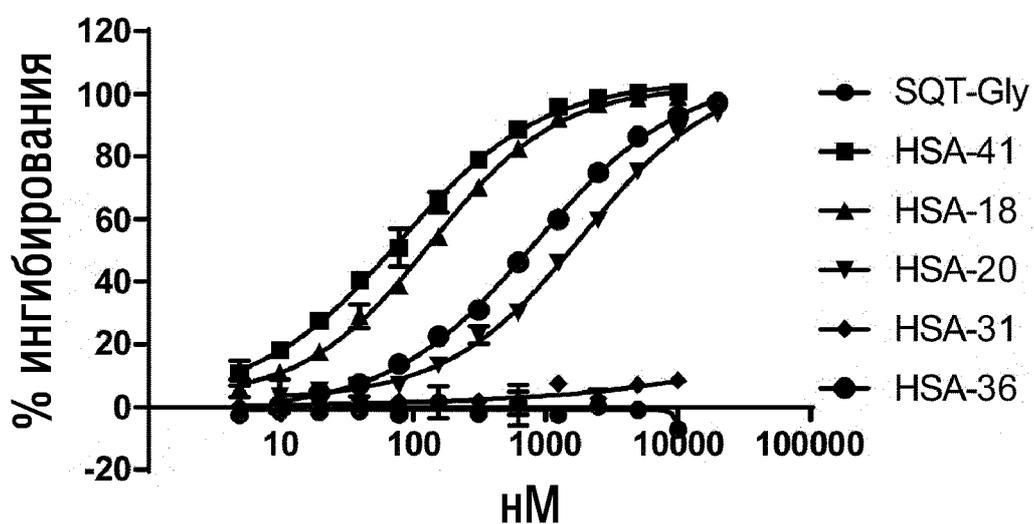


Affimer	Время полужизни (часы)
HSA-41 AH	71
HSA-41 DI	103

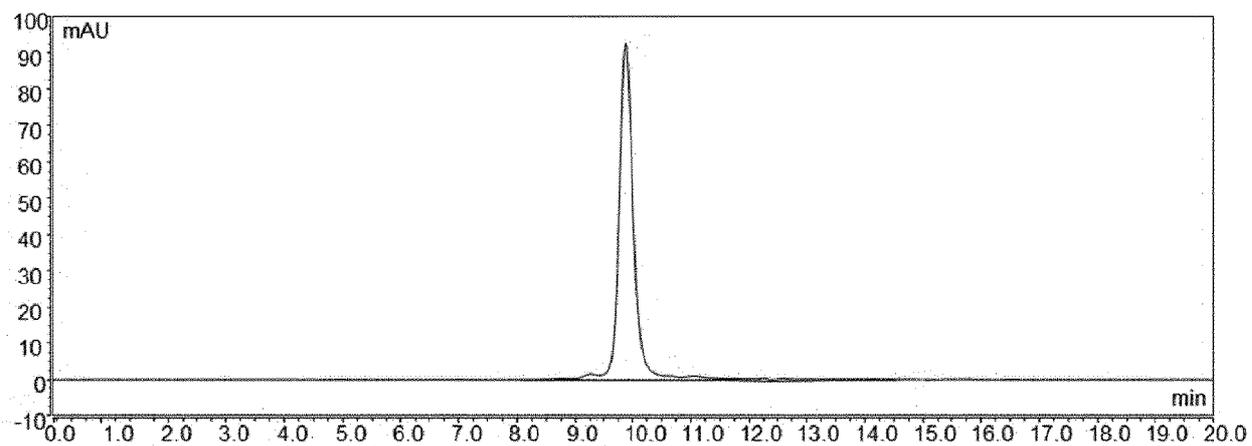
ФИГ.36



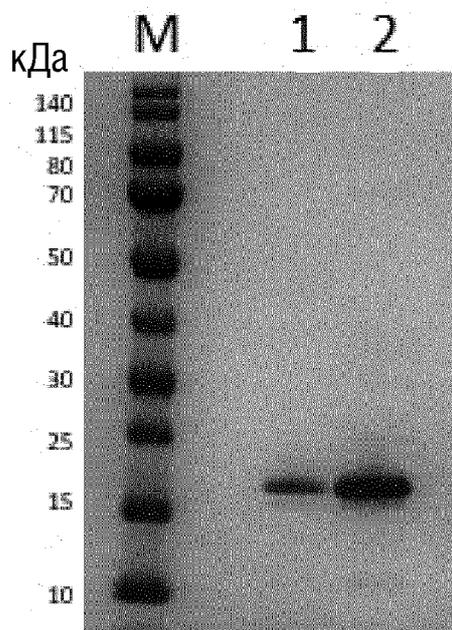
ФИГ.37



ФИГ.38А

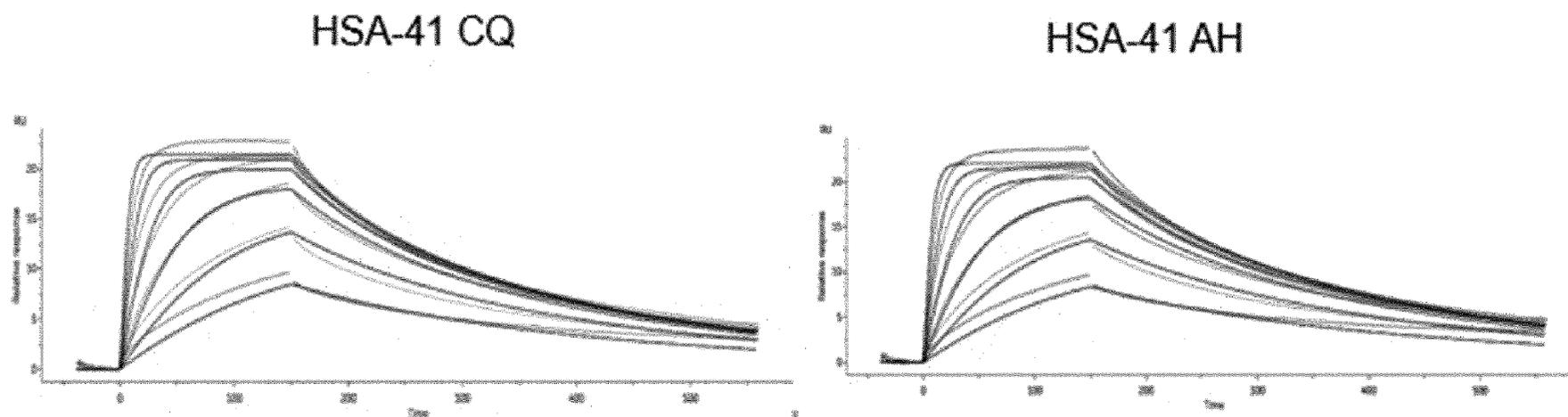


ФИГ.38В



Дорожка	Образец
M	Предварительно окрашенный маркер молекулярной массы PageRuler
1	1 мкг восстановленный
2	5 мкг восстановленный

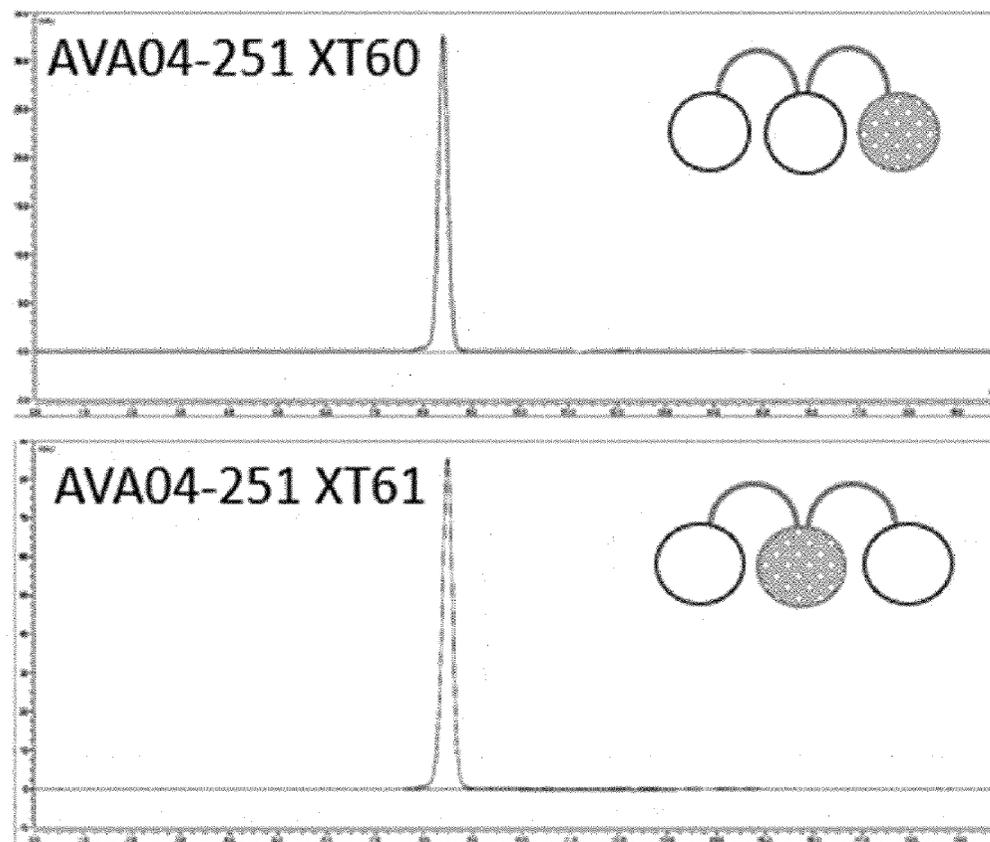
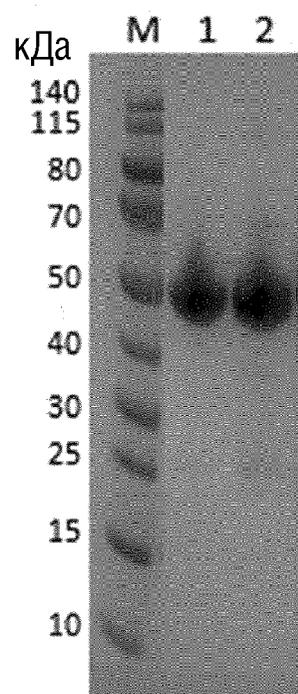
ФИГ.39



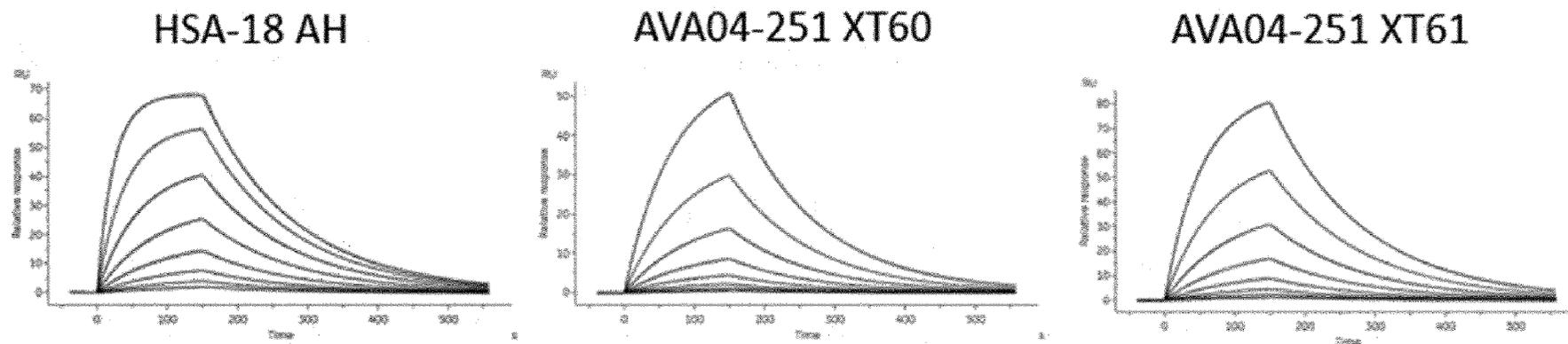
Affimer	Кинетика $\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (M)
HSA-41 CQ	4.88E-01	2.07E+06	6.63E-03	3.21E-09
HSA-41 AH	5.40E-01	1.69E+06	5.63E-03	3.34E-09

ФИГ.40

Формат	Ориентация affimer
AVA04-251 XT60	251-251-18
AVA04-251 XT61	251-18-251

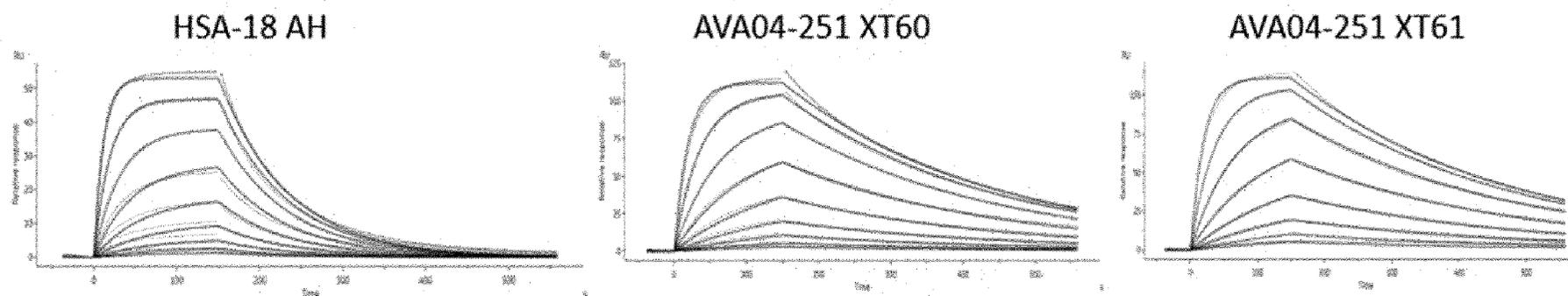


# ФИГ.41А



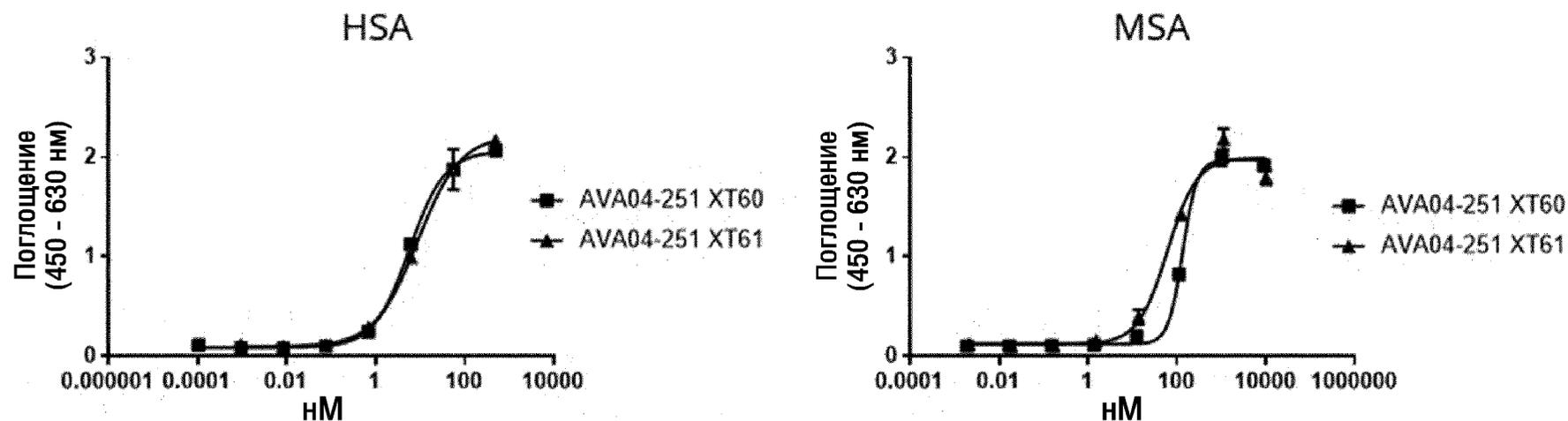
Affimer	Формат	Кинетика $\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (M)
HSA-18 AH	Мономер	1.12E-01	7.14E+04	7.80E-03	1.09E-07
AVA04-251 XT60	Тример, 251-251-18	4.13E-02	1.28E+04	8.46E-03	6.61E-07
AVA04-251 XT61	Тример, 251-18-251	1.29E-01	2.33E+04	7.58E-03	3.25E-07

# ФИГ.41В



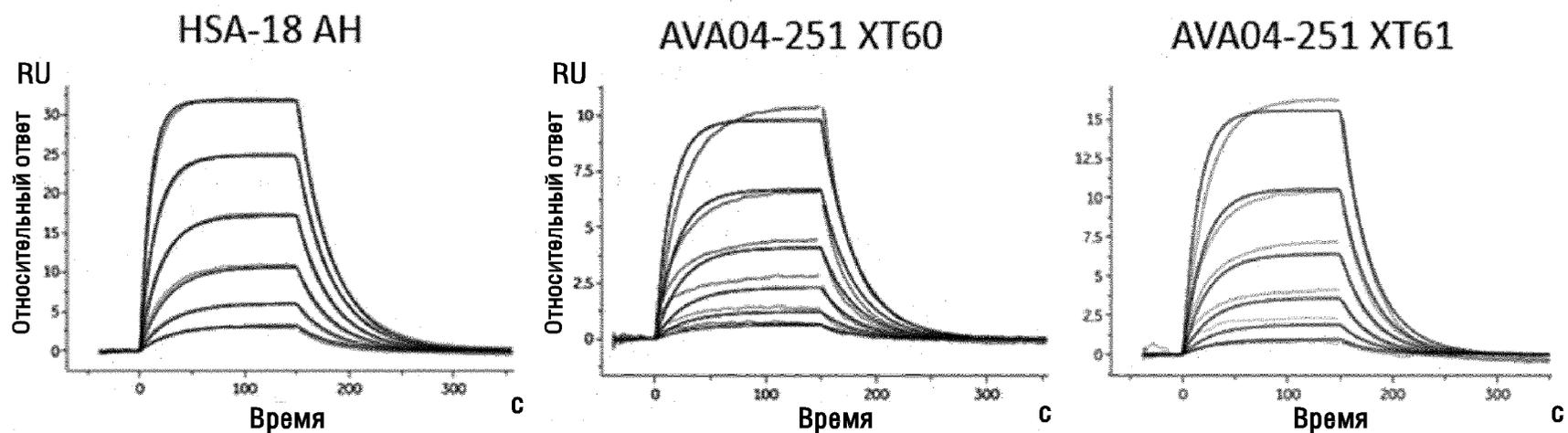
Affimer	Формат	Кинетика $\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (M)
HSA-18 AH	мономер	1.08E+00	8.00E+04	1.22E-02	1.52E-07
AVA04-251 XT60	Тример, 251-251-18	1.99E+00	5.01E+04	3.39E-03	6.78E-08
AVA04-251 XT61	Тример, 251-18-251	2.56E+00	9.88E+04	3.08E-03	3.11E-08

# ФИГ.42



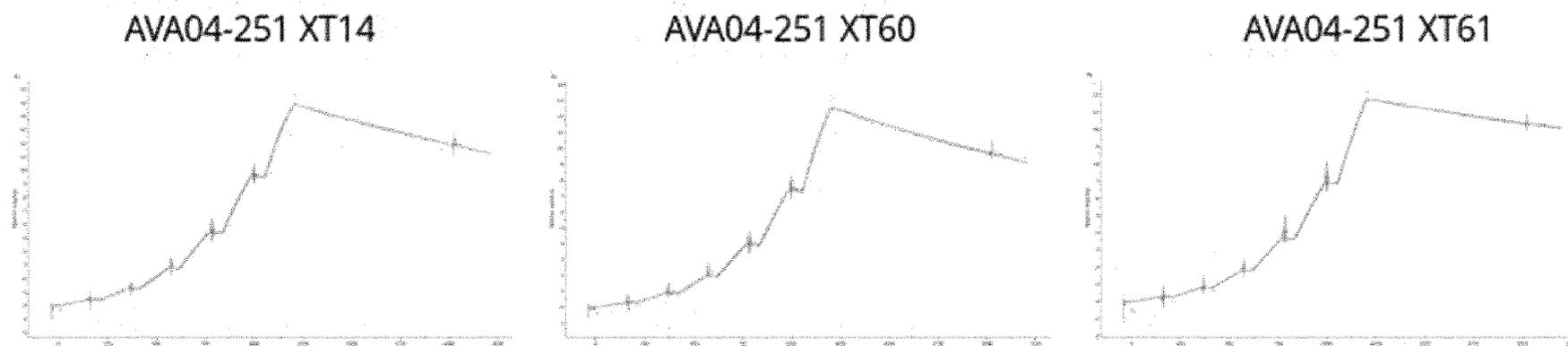
Формат	HSA EC <sub>50</sub> (нМ)	MSA EC <sub>50</sub> (нМ)
AVA04-251 XT60	5.7	133.6
AVA04-251 XT61	8.8	60.8

# ФИГ.43



Affimer	Формат	Кинетика $\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (M)
HSA-18 AH	ХТ мономер	1.28E-01	6.02E+05	2.98E-02	4.94E-08
AVA04-251 XT60	Тример, 251-251-18	6.28E-02	3.01E+05	3.26E-02	1.08E-07
AVA04-251 XT61	Тример, 251-18-251	1.59E-01	2.97E+05	3.37E-02	1.13E-07

# ФИГ.44



Affimer	Формат	Кинетика Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
AVA04-251 XT14	Тример, 251-251-41	6.20E-02	9.03E+05	2.77E-04	3.07E-10
AVA04-251 XT60	Тример, 251-251-18	4.54E-02	5.94E+05	3.31E-04	5.58E-10
AVA04-251 XT61	Тример, 251-18-251	7.55E-02	5.34E+05	1.59E-04	2.98E-10