



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/468 (2022.01); C07K 16/241 (2022.01); C07K 16/244 (2022.01); C07K 16/2809 (2022.01); C07K 16/2818 (2022.01); C07K 16/2887 (2022.01); A61K 39/395 (2022.01); A61K 2039/505 (2022.01); C07K 2317/31 (2022.01); C07K 2317/35 (2022.01); C07K 2317/52 (2022.01); C07K 2317/522 (2022.01); C07K 2317/55 (2022.01); C07K 2317/56 (2022.01); C07K 2317/64 (2022.01); C07K 2317/66 (2022.01); C07K 2317/76 (2022.01); C07K 2319/00 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2020142965, 24.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.12.2014

Дата регистрации:
28.03.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.12.2013 CN PCT/CN2013/090923

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2016129959 30.12.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2021 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 28.03.2022 Бюл. № 10

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):
У, Чэнбинь (CN)

(73) Патентообладатель(и):
ЭПИМАБ БИОТЕРАПЬЮТИКС ИНК.
(CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20090155275 A1, 18.06.2009. US
20090155275 A1, 18.06.2009. US 2005250185 A1,
10.11.2005. WO 2010000721 A1, 07.01.2010. US
7838638 B2, 23.11.2010. GALL, J. M., et al. T cells
armed with anti-CD3 x anti-CD20 bispecific
antibody enhance killing of CD20+ malignant B
cells and bypass complement-mediated rituximab
resistance in vitro. Experimental (см. прод.)

(54) ИММУНОГЛОБУЛИН С ТАНДЕМНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ FAV-ФРАГМЕНТОВ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к мультивалентным и мультиспецифическим связывающим белкам и их применению. Связывающий белок содержит три полипептидные цепи: первая полипептидная цепь содержит от amino-конца к карбоксильному концу (i) VLA-CL-VHB-CH1-Fc, где CL слит непосредственно с VHB, либо (ii) VHB-CH1-VLA-CL-Fc, где CH1 слит непосредственно с VLA, и при этом между вариабельными доменами и константными доменами нет встроенных линкеров; вторая полипептидная цепь содержит

от amino-конца к карбоксильному концу VHA-CH1, при этом между VHA и CH1 нет встроенных линкеров; третья полипептидная цепь содержит от amino-конца к карбоксильному концу VLB-CL, при этом между VLB и CL нет встроенных линкеров. При этом две из указанных первых полипептидных цепей, две из указанных вторых полипептидных цепей и две из указанных третьих полипептидных цепей способны ассоциировать с образованием тетравалентного связывающего белка с двойной специфичностью, содержащего шесть полипептидных цепей, содержащих четыре

функциональных связывающих участка Fab. Указанный связывающий белок связывает как эпитоп или антиген А, так и эпитоп или антиген В. При этом А и В являются разными эпитопами одного антигена или разными антигенами. Связывающие белки могут быть использованы для лечения или предотвращения острых и хронических воспалительных заболеваний и

нарушений, аутоиммунных заболеваний, злокачественных опухолей и других заболеваний и нарушений. Предложенная конструкция обеспечивает достаточную гибкость и соответствующие размерные параметры для двойного связывания в отсутствие пептидного спейсера между 2 Fab-связывающими областями. 5 н. и 27 з.п. ф-лы, 7 ил., 16 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

Hematology, 2005, v.33, no.4, p.452-459. doi:10.1016/j.exphem.2005.01.007. MIOSSEC P. AND KOLLS J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. Nature Reviews Drug Discovery, 2012, v.11, p.763-776. DHIMOLEA, E., & REICHERT, J. M. Poster Sessions. mAbs, 2012, 4(1), p.14-16. doi:10.4161/mabs.19908. CURRAN, M. A., et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, v.107, no.9, p.4275-4280. doi:10.1073/pnas.0915174107. RU 2012121189 A, 27.11.2013.

R U 2 7 6 9 1 3 3 C 2

R U 2 7 6 9 1 3 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/468 (2022.01); *C07K 16/241* (2022.01); *C07K 16/244* (2022.01); *C07K 16/2809* (2022.01); *C07K 16/2818* (2022.01); *C07K 16/2887* (2022.01); *A61K 39/395* (2022.01); *A61K 2039/505* (2022.01); *C07K 2317/31* (2022.01); *C07K 2317/35* (2022.01); *C07K 2317/52* (2022.01); *C07K 2317/522* (2022.01); *C07K 2317/55* (2022.01); *C07K 2317/56* (2022.01); *C07K 2317/64* (2022.01); *C07K 2317/66* (2022.01); *C07K 2317/76* (2022.01); *C07K 2319/00* (2022.01)

(21)(22) Application: **2020142965, 24.12.2014**(24) Effective date for property rights:
24.12.2014Registration date:
28.03.2022

Priority:

(30) Convention priority:

30.12.2013 CN PCT/CN2013/090923Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2016129959 30.12.2013(43) Application published: **10.02.2021 Bull. № 4**(45) Date of publication: **28.03.2022 Bull. № 10**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

WU, Chengbin (CN)

(73) Proprietor(s):

EPIMAB BIOTHERAPEUTICS INC. (CN)(54) **IMMUNOGLOBULIN WITH TANDEM ARRANGEMENT OF FAB FRAGMENTS AND APPLICATION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to multivalent and multispecific binding proteins and an application thereof. Binding protein contains three polypeptide chains: the first polypeptide chain contains, from the amino terminus to the carboxy terminus, (i) VLA-CL-VHB-CH1-Fc, where CL is fused directly to VHB, or (ii) VHB-CH1-VLA-CL-Fc, where CH1 is fused directly to VLA, and wherein there are no inserted linkers between the variable domains and constant domains; the second polypeptide chain contains, from the amino terminus to the carboxy terminus, VHA-CH1, wherein there are no inserted linkers between VHA and

CH1; the third polypeptide chain contains, from the amino terminus to the carboxy terminus, VLB-CL, wherein there are no inserted linkers between VLB and CL. Two of said first polypeptide chains, two of said second polypeptide chains, and two of said third polypeptide chains are therein capable of associating forming a tetravalent binding protein with double specificity containing six polypeptide chains containing four Fab functional binding fragments. Said binding protein binds both epitope or antigen A and epitope or antigen B. A and B therein constitute different epitopes of the same antigen or different antigens.

EFFECT: binding proteins can be used for treating

or preventing acute and chronic inflammatory diseases and disorders, autoimmune diseases, malignant tumours, and other diseases and disorders; proposed structure provides sufficient flexibility and corresponding

dimensional parameters for double binding in the absence of a peptide spacer between 2 Fab-binding regions.

32 cl, 7 dwg, 16 tbl, 4 ex

R U 2 7 6 9 1 3 3 C 2

R U 2 7 6 9 1 3 3 C 2

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной международной заявке № PCT/CN2013/090923, поданной 30 декабря 2013 года, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к мультивалентным и мультиспецифическим связывающим белкам, и к способам получения и применения мультивалентных и мультиспецифических связывающих белков.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПОДАННОЕ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Содержание текстового файла, поданного в электронном виде, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки: копия перечня последовательностей в формате, читаемом на компьютере (имя файла: EPBI_001_01W O_SeqList_ST25.txt, дата записи: 2 декабря 2014 года, размер файла 98 KB).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Биспецифические или мультиспецифические антитела были созданы при попытках получения молекул, подходящих для лечения различных воспалительных заболеваний, злокачественных новообразований и других нарушений.

[0005] Биспецифические антитела были получены с использованием квадромной технологии (см. Milstein, C. and A.C. Cuello, Nature, 1983. 305(5934): p. 537-40), основанной на слиянии протопластов двух разных клеточных линий гибридом, экспрессирующих моноклональные антитела мыши с требуемыми уровнями специфичности биспецифического антитела. Биспецифические антитела также можно получать путем химической конъюгации двух разных мАТ (см. Staerz, U.D., et al., Nature, 1985. 314(6012): p. 628-31). В других подходах была использована химическая конъюгация двух разных моноклональных антител или меньших фрагментов антител (см. Brennan, M., et al., Science, 1985. 229(4708): p. 81-3).

[0006] Другой способ заключается в соединении двух родительских антител с помощью гетеробифункционального сшивающего средства. В частности, два разные Fab-фрагмента были химически и сайт-специфически сшиты по цистеиновым остаткам шарнирной области (см. Glennie, M.J., et al., J Immunol, 1987. 139(7): p. 2367-75).

[0007] За последнее время были разработаны другие форматы рекомбинантных биспецифических антител (см. Kriangkum, J., et al., Biomol Eng, 2001. 18(2): p. 31-40). Из их числа для конструирования рекомбинантных биспецифических антител были использованы tandemные одцепочечные Fv-молекулы и диатела, а также разные их производные. Как правило, конструкция этих молекул начинается с двух одцепочечных Fv-фрагментов (scFv), которые распознают разные антигены (см. Economides, A.N., et al., Nat Med, 2003. 9(1): p. 47-52). Tandемные scFv-молекулы (taFv) имеют простую конструкцию, в которой две молекулы scFv соединены дополнительным пептидным линкером. Два scFv-фрагмента, содержащиеся в таких tandemных scFv-молекулах, формируют отдельные элементы пространственной структуры. Для соединения двух scFv-фрагментов могут быть использованы различные линкеры и линкеры, длина которых составляет до 63 остатков (см. Nakanishi, K., et al. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 423-74).

[0008] В недавнем исследовании сообщалось об экспрессии tandemного scFv, направленного против CD28, и ассоциированного с меланомой протеогликана, *in vivo* у трансгенных кроликов и крупного рогатого скота (см. Grade, J.A., et al., J Clin Invest, 1999. 104(10): p. 1393-401). В этой конструкции две scFv-молекулы были связаны с помощью линкера CH1, и было установлено, что концентрация биспецифического

антитела в сыворотке крови составляет до 100 мг/л. В настоящее время в нескольких исследованиях сообщалось об экспрессии растворимых тандемных scFv-молекул у бактерий (см. Leung, B.P., et al., *J Immunol*, 2000. 164(12): p. 6495-502; Ito, A., et al., *J Immunol*, 2003. 170(9): p. 4802-9; Karni, A., et al., *J Neuroimmunol*, 2002. 125(1-2): p. 134-40) с использованием либо очень короткого линкера A1a3, либо длинных линкеров, богатых глицином/серином.

[0009] В недавнем исследовании с помощью фагового дисплея набора тандемных scFv, содержащих промежуточные линкеры произвольной длины от 3 или 6 остатков, был расширен спектр тех молекул, которые получают в растворимой и активной форме в клетках бактерий. В результате применения этого подхода была выделена предпочтительная тандемная scFv-молекула с использованием линкера, состоящего из 6 аминокислотных остатков (см. Arndt, M. and J. Krauss, *Methods Mol Biol*, 2003. 207: p. 305-21).

[0010] Для экспрессии биспецифических диател (Db) применяют формат диатела. Диатела получают из scFv-фрагментов путем уменьшения длины линкера, соединяющего VH- и VL- домен, до приблизительно 5 остатков (см. Peipp, M. and T. Valerius, *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(4): p. 507-11). Уменьшение длины линкера способствует димеризации двух полипептидных цепей путем попарного соединения доменов VH и VL с образованием перекрестных связей между ними. Биспецифические диатела получают путем экспрессии двух полипептидных цепей либо со структурой VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), либо VLA-VHB и VLB-VHA (VL-VH конфигурация) в одной и той же клетке. Недавнее сравнительное исследование показывает, что ориентация переменных доменов может оказывать влияние на экспрессию и формирование активных сайтов связывания (см. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995. 92(15): p. 7021-5).

[0011] Одним из подходов, обеспечивающих создание биспецифических диател, является получение диател со структурой типа «выступ-во-впадину» (см. Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90(14): p. 6444-8.18). Это было показано для биспецифического диатела, направленного против HER2 и CD3. Был сформирован большой выступ в VH-домене путем замены Val37 на Phe и Leu45 на Trp, а комплементарная впадина в VL-домене была создана путем замены с помощью мутации Phe98 на Met и Tyr87 на Ala, в переменных доменах, специфичных либо к HER2, либо к CD3. С помощью использования этого подхода производство биспецифических диател может быть увеличено до 72% за счет родственных диател, до более 90% за счет диател со структурой типа «выступ-во-впадину».

[0012] Получение одноцепочечных диател (scDb) представляет собой альтернативную стратегию для улучшения образования биспецифических молекул, подобных диателам (см. Holliger, P. and G. Winter, *Рак Immunol Immunother*, 1997. 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al., *Immunotechnology*, 1996. 2(1): p. 21-36). Биспецифические одноцепочечные диатела получают путем соединения двух диатело-формирующих полипептидных цепей с использованием дополнительного промежуточного линкера с длиной приблизительно 15 аминокислотных остатков. Следовательно, все молекулы с молекулярной массой, соответствующей мономерным одноцепочечным диателам (50-60 кДа), являются биспецифическими. В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что биспецифические одноцепочечные диатела экспрессируются в клетках бактерий в растворимой и активной форме, причем большинство очищенных молекул содержатся в виде мономеров (см. Holliger, P. and G. Winter, *Рак Immunol Immunother*, 1997. 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al., *Immunotechnology*, 1996. 2(1): p. 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack,

Immunotechnology, 1997. 3(2): p. 83-105; Ridgway, J.B., et al., Protein Eng, 1996. 9(7): p. 617-21).

[0013] Диатела были слиты с Fc-фрагментом для создания более Ig-подобных молекул, называемых ди-диатела (см. Lu, D., et al., J Biol Chem, 2004. 279(4): p. 2856-65). В дополнение к этому, была описана конструкция мультивалентного антитела, содержащая два Fab-повтора в тяжелой цепи IgG и способная к связыванию четырех молекул антигена (см. патент США 8722859 B2 и Miller, K., et al., J Immunol, 2003. 170(9): p. 4854-61).

[0014] Наиболее новыми примерами являются тетравалентные слитые одноцепочечные вариабельные фрагменты IgG (scFv) (Dong J, et al., 2011 MAbs 3:273-288; Coloma MJ, Morrison SL 1997 Nat Biotechnol 15:159-163; Lu D, et al., 2002 J Immunol Methods 267:213-226), катумаксомаб, трифункциональное химерное (крыса/мышь) биспецифическое антитело к молекулам адгезии CD3 эпителиальных клеток (Lindhofer H, et al 1995 J Immunol 155:219-225), биспецифическое scFv-антитело блинатумомаб к CD19-CD3 (Bargou R, et al., 2008 Science 321:974-977), антитела типа «Fab двойного действия» (DAF) (Bostrom J, et al., 2009 Science 323:1610-1614), содержащие фармакофорные группы пептиды, ковалентно связанные с каталитическими антителами (Doppalapudi VR, et al. 2010 Proc Natl Acad Sci USA 107:22611-22616), использование динамического обмена между половинами молекул IgG4 для создания биспецифических антител (van der Neut Kolfshoten M, et al., 2007 Science 317:1554-1557; Stubenrauch K, et al., 2010 Drug Metab Dispos 38:84-91), или путем обмена доменами тяжелой цепи и легкой цепи внутри антигенсвязывающего фрагмента (Fab) одной половины биспецифического антитела (формат CrossMab) (Schacfer W et al., 2011 Proc Natl Acad Sci 108:11187-92).

[0015] В данной области техники существует необходимость в получении одиночных молекул, обладающих способностью связывать два антигена, и в способах создания таких мультивалентных и мультиспецифических связывающих белков. Настоящее изобретение направлено на решение этой задачи.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] В настоящем изобретении предложены мультивалентные и мультиспецифические связывающие белки и способы получения и использования таких связывающих белков. В одном варианте реализации изобретения мультивалентными и мультиспецифическими связывающими белками, предложенными в данном документе, являются иммуноглобулины с тандемным расположением Fab-фрагментов (FIT-Ig), и они способны к связыванию двух или более антигенов, или двух или более эпитопов одного и того же антигена, или двух или более копий одного и того же эпитопа.

Мультивалентные и мультиспецифические связывающие белки, предложенные в данном документе, могут быть использованы для лечения и/или предотвращения острых и хронических воспалительных заболеваний и нарушений, аутоиммунных заболеваний, злокачественных опухолей, повреждений спинного мозга, сепсиса и других заболеваний, нарушений и состояний. В данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие мультивалентные и мультиспецифические связывающие белки. В дополнение к этому, в данном документе предложены нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессирующие векторы и клетки-хозяева для получения таких FIT-Ig. Также настоящим изобретением охватываются способы использования FIT-Ig по настоящему изобретению для детекции специфических антигенов *in vivo* или *in vitro*.

[0017] В настоящем изобретении предложено семейство связывающих белков, которые способны к связыванию двух или более антигенов, например, с высокой аффинностью. В одном аспекте в настоящем изобретении предложен подход к конструированию биспецифического связывающего белка с использованием двух родительских

моноклональных антител: мАТ А, которое связывается с антигеном А, и мАТ В, которое связывается с антигеном В. Связывающие белки, раскрытые в данном документе, В одном варианте реализации изобретения способны к связыванию антигенов, цитокинов, хемокинов, рецепторов цитокинов, рецепторов хемокинов, молекул, родственных цитокинам или хемокинам, или белков клеточной поверхности.

[0018] Таким образом, в одном аспекте предложены связывающие белки способны к связыванию двух или более антигенов. В одном варианте реализации изобретения в настоящем изобретении предложен связывающий белок, содержащий по меньшей мере две полипептидные цепи, причем пары полипептидных цепей образуют IgG-подобные молекулы, способные к связыванию двух или более антигенов. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит две, три, четыре, пять, или более полипептидных цепей. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере один VL_A , по меньшей мере один VL_B , по меньшей мере один VH_A , по меньшей мере один VH_B , по меньшей мере один CL , и по меньшей мере один $CH1$, причем VL представляет собой вариабельный домен легкой цепи, VH представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, А представляет собой первый антиген, а В представляет собой второй антиген. В дополнительном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит VL_A , CL , VH_B и $CH1$. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок дополнительно содержит Fc . В другом варианте реализации изобретения Fc -область представляет собой вариант Fc -области. В дополнительном варианте реализации изобретения вариант Fc -области обладает измененной эффекторной функцией, такой как ADCC или CDC. В другом варианте реализации изобретения вариант Fc -области проявляет измененную аффинность или авидность по отношению к одному или более $Fc\gamma R$.

[0019] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит три полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь содержит VL_A , CL , VH_B и $CH1$, вторая полипептидная цепь содержит VH_A и $CH1$, и третья полипептидная цепь содержит VL_B и CL . В дополнительном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь связывающего белка дополнительно содержит Fc . В другом варианте реализации изобретения связывающий белок содержит две полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь содержит VL_A , CL , VH_B и $CH1$, вторая полипептидная цепь содержит VH_A , $CH1$, VL_B , и CL . В дополнительном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь дополнительно содержит Fc .

[0020] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит три полипептидные цепи, а молярное соотношение соответствующих кДНК первая : вторая : третья при осуществлении котрансфекции составляет 1:1:1, 1:1.5:1, 1:3:1, 1:1:1.5, 1:1:3, 1:1.5:1.5, 1:3:1.5, 1:1.5:3 или 1:3:3. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок содержит две полипептидные цепи, а молярное соотношение соответствующих кДНК первая : вторая при осуществлении котрансфекции составляет 1:1, 1:1.5 или 1:3, или они используются в любых других соотношениях, что достигается посредством оптимизации, с целью получения максимального выхода фракции мономерных FIT-Ig при каждой конкретной трансфекции.

[0021] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению не содержит пептидного линкера. В одном варианте реализации

изобретения связывающий белок по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один аминокислотный или полипептидный линкер. В дополнительном варианте реализации изобретения линкер выбран из группы, состоящей из G,GS, SG,GGG, GSG, SGG, GGG, GGGG, SGGG, GGGG, GGGGSGS, GGGGSGS, GGGGSGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, AKTTPKLEEGEFSEARV, SAKTTP, SAKTTPKLGG, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, RADAAA(G₄S)₄, SAKTTP, SAKTTPKLGG, S AKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVFIFPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTPLAP, AKTTAP, AKTTAPSVYPLAP, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, GENKVEYAPALMALS, GPAKELTPLKEAKVS и GHEAAVMQVQYPAS. Линкеры также могут представлять собой пептидные линкеры, расщепляемые *in vivo*, линкеры, чувствительные к протеазам (таким как MMP), линкеры на основе дисульфидной связи, которые могут расщепляться путем восстановления и т.д., как было ранее описано (Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, edited by Stefan R. Schmidt), или любые расщепляемые линкеры, известные в данной области техники. Такие расщепляемые линкеры могут быть использованы для высвобождения верхнего Fab *in vivo* для различных целей, для того чтобы улучшить проникновение в ткани/клетки и распределение, усилить связывания с мишенями, уменьшить потенциальное побочное действие, а также модулировать *in vivo* функциональный и физический период полувыведения 2 разных Fab-областей.

[0022] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит первый полипептид, содержащий в направлении от amino- к карбоксильному концу VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc, вторую полипептидную цепь, содержащую в направлении от amino- к карбоксильному концу VH_A-CH1, и третью полипептидную цепь, содержащую в направлении от amino- к карбоксильному концу VL_B-CL; причем VL представляет собой вариабельный домен легкой цепи, CL представляет собой константный домен легкой цепи, VH представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, A представляет собой первый эпитоп или антиген, и B представляет собой второй эпитоп или антиген. В одном варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой IgG1 человека. В другом варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой вариант Fc-области. В дополнительном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность Fc-области по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 20. В дополнительном варианте реализации изобретения CL первой полипептидной цепи слит непосредственно с VH_B. В другом варианте реализации изобретения CL первой полипептидной цепи связан с VH_B через аминокислотный или олигопептидный линкер. В дополнительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой GSG (SEQ ID NO: 26) или GGGGSGS (SEQ ID NO: 28).

[0023] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок содержит первый полипептид, содержащий в направлении от amino- к карбоксильному концу VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc, вторую полипептидную цепь, содержащую в направлении от amino- к карбоксильному концу VH_A-CH1, и третью полипептидную цепь, содержащую в направлении от amino- к карбоксильному концу VL_B-CL; причем VL представляет собой вариабельный домен легкой цепи, CL представляет собой константный домен

легкой цепи, VH представляет собой переменный домен тяжелой цепи, CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, A представляет собой первый эпитоп или антиген, и B представляет собой второй эпитоп или антиген. В одном варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой IgG1 человека. В другом варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой вариант Fc-области. В дополнительном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность Fc-области по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 20. В одном варианте реализации изобретения CH1 первой полипептидной цепи слит непосредственно с VL_A. В другом варианте реализации изобретения CH1 первой полипептидной цепи связан с VL_A через аминокислотный или олигопептидный линкер. В дополнительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой GSG (SEQ ID NO: 26) или GGGGSGS (SEQ ID NO: 28).

[0024] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок содержит первый полипептид, содержащий в направлении от амино- к карбоксильному концу VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc, и вторую полипептидную цепь, содержащую в направлении от амино- к карбоксильному концу VH_A-CH1-VL_B-CL; причем VL представляет собой переменный домен легкой цепи, CL представляет собой константный домен легкой цепи, VH представляет собой переменный домен тяжелой цепи, CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, A представляет собой первый эпитоп или антиген, и B представляет собой второй эпитоп или антиген. В одном варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой IgG1 человека. В другом варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой вариант Fc-области. В дополнительном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность Fc-области по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 20. В дополнительном варианте реализации изобретения CL первой полипептидной цепи слит непосредственно с VH_B. В другом варианте реализации изобретения CL первой полипептидной цепи связан с VH_B через аминокислотный или олигопептидный линкер. В дополнительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой GSG (SEQ ID NO: 26) или GGGGSGS (SEQ ID NO: 28).

[0025] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок содержит первый полипептид, содержащий в направлении от амино- к карбоксильному концу VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc, и вторую полипептидную цепь, содержащую в направлении от амино- к карбоксильному концу VL_B-CL-VH_A-CH1; причем VL представляет собой переменный домен легкой цепи, CL представляет собой константный домен легкой цепи, VH представляет собой переменный домен тяжелой цепи, CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, A представляет собой первый эпитоп или антиген, и B представляет собой второй эпитоп или антиген. В одном варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой IgG1 человека. В другом варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой вариант Fc-области. В дополнительном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность Fc-области по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 20.

мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 20. В одном варианте реализации изобретения СН1 первой полипептидной цепи слит непосредственно с VL_A. В другом варианте реализации изобретения СН1 первой полипептидной цепи связан с VL_A через аминокислотный или олигопептидный линкер. В дополнительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой GSG (SEQ ID NO: 26) или GGGGSGS (SEQ ID NO: 28).

[0026] Связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию пар цитокинов. Например, связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию пар цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-1 α и ИЛ-1 β ; ИЛ-12 и ИЛ-18, TNF α и ИЛ-23, TNF α и ИЛ-13; ФНО и ИЛ-18; ФНО и ИЛ-12; ФНО и ИЛ-1-бета; ФНО и MIF; ФНО и ИЛ-6, ФНО и рецептора ИЛ-6, ФНО и ИЛ-17; ИЛ-17 и ИЛ-20; ИЛ-17 и ИЛ-23; ФНО и ИЛ-15; ФНО и VEGF; VEGFR и EGFR; PDGER и VEGF, ИЛ-13 и ИЛ-9; ИЛ-13 и ИЛ-4; ИЛ-13 и ИЛ-5; ИЛ-13 и ИЛ-25; ИЛ-13 и TARC; ИЛ-13 и MDC; ИЛ-13 и MIF; ИЛ-13 и TGF- β ; ИЛ-13 и агониста LHR; ИЛ-13 и CL25; ИЛ-13 и SPRR2a; ИЛ-13 и SPRR2b; ИЛ-13 и ADAM8; и TNF α , и PGE4, ИЛ-13 и PED2, ФНО и PEG2. В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20. Связывающие белки по настоящему изобретению в одном варианте реализации изобретения способны к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20 и содержат вариабельные области тяжелых и легких цепей, полученные из антитела LY к ИЛ-17 и антитела 15D2 к ИЛ-20. В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию ИЛ-17 и ФНО. Связывающие белки по настоящему изобретению в одном варианте реализации изобретения способны к связыванию ИЛ-17 и ФНО и содержат вариабельные области тяжелых и легких цепей, полученные из антитела LY к ИЛ-17 и антитела голимумаб, специфичного к ФНО.

[0027] В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению связывают ИЛ-17 и ИЛ-20 и содержат первый полипептид, включающий, состоящий, по существу, из или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 25 и 27; вторую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21; и третью полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 23. В другом варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению связывают ИЛ-27 и ИЛ-20 и содержат первую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 25 и 27, и вторую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30 и 31.

[0028] В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению связывают ФНО и ИЛ-17 и содержат первый полипептид, включающий, состоящий, по существу, из или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 87; вторую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 89; и третью полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 91.

[0029] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию пар мишеней, выбранных из группы, состоящей из CD137 и CD20, CD137 и EGFR, CD137 и Her-2, CD137 и PD-1, CD137 и PDL-1, VEGF и PD-L1, Lag-3 и TIM-3, OX40 и PD-1, TIM-3 и PD-1, TIM-3 и PDL-1, EGFR и DLL-4, CD138 и CD20; CD138 и CD40; CD19 и CD20; CD20 и CD3; CD3 и CD33; CD3 и CD133; CD47 и CD20, CD38 и CD138; CD38 и CD20; CD20 и CD22; CD38 и CD40; CD40 и CD20; CD-8 и ИЛ-6; CSPG и RGM A; CTLA-4 и BTNO2; IGF1 и IGF2; IGF1/2 и Erb2B; IGF-1R и EGFR; EGFR и CD13; IGF-1R и ErbB3; EGFR-2 и IGFR; VEGFR-2 и Met; VEGF-A и Ангиопоэтина-2 (Ang-2); ИЛ-12 и TWEAK; ИЛ-13 и ИЛ-1-бета; PDGFR и VEGF, EpCAM и CD3, Her2 и CD3, CD19 и CD3, EGFR и Her3, CD16a и CD30, CD30 и PSMA, EGFR и CD3, CEA и CD3, TROP-2 и HSG, TROP-2 и CD3, MAG и RGM A; NgR и RGM A; NogoA и RGM A; OMGr и RGM A; PDL-1 и CTLA-4; CTLA-4 и PD-1; PD-1 и TIM-3; RGM A и RGM B; Те38 и ФНО; ФНО и Blys; ФНО и CD-22; ФНО и домена CTLA-4; ФНО и GP130; ФНО и ИЛ-12p40; и ФНО и лиганда RANK, Фактора IXa, Фактора X. В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию CD3 и CD20. Связывающие белки по настоящему изобретению в одном варианте реализации изобретения способны к связыванию CD3 и CD20 и содержат вариабельные области тяжелых и легких цепей, полученных из антитела ОКТ3 к CD3 и антитела офатумумаб, специфичного к CD20. В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению способны к связыванию CTLA-4 и PD-1. Связывающие белки по настоящему изобретению в одном варианте реализации изобретения способны к связыванию CTLA-4 и PD-1 и содержат вариабельные области тяжелых и легких цепей, полученных из антитела ипилимумаб, специфичного к CTLA-4, и антитела ниволумаб, специфичного к PD-1.

[0030] В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению связывают CD3 и CD20 и содержат первую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41 и 48; вторую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 44; и третью полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 46.

[0031] В одном варианте реализации изобретения связывающие белки по настоящему изобретению связывают CTLA-4 и PD-1 и содержат первую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 92; вторую полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 95; и третью полипептидную цепь, содержащую, состоящую преимущественно из или состоящую исключительно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 97.

[0032] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок, предложенный в данном документе, способен к связыванию одного или более эпитопов на CTLA-4. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок, предложенный в данном документе, способен к связыванию одного или более эпитопов на PD-1.

[0033] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на одном или более белках иммунной

контрольной точки на Т-клетках, таких как, например, TIM-3, Lag3, ICOS, BTLA, CD160, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L и A2aR. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на одном или более белках поверхности опухолевых клеток, которые вовлечены в сигнальные пути

5 иммунных контрольных точек, таких как, например, PD-L1, PD-L2, Галектин-9, HVEM, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70 и CD40.

[0034] В одном аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающие белки, описанные в данном документе. В одном варианте реализации изобретения предложены фармацевтические композиции,

10 содержащие связывающий белок по любому из предшествующих пунктов и одного или более фармацевтически приемлемых носителей.

[0035] В другом аспекте, настоящего изобретения предложены способы лечения или предотвращения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, рака, сепсиса или повреждения спинного мозга у

15 субъекта, который в этом нуждается. В одном варианте реализации изобретения способ включает введение субъекту эффективного количества одного или более связывающих белков, предложенных в данном документе, или одной или более фармацевтических композиций, содержащих связывающие белки, предложенные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В данном документе также предложены области

20 применения связывающих белков, описанных в данном документе, в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, рака или повреждения спинного мозга. В одном варианте реализации изобретения воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или нейродегенеративное заболевание выбраны из группы,

25 состоящей из астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, множественного склероза, болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона.

[0036] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения ревматоидного артрита, псориаза, остеопороза, инсульта, заболевания печени или рака ротовой полости у субъекта, который в этом

30 нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, 25 и 27; и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:

35 21; и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, 25 и 27; и аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29, 30 и 31.

[0037] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены

40 способы лечения или предотвращения В-клеточного рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, причем связывающий белок FIT-Ig способен к связыванию одного или более В-клеточных антигенов. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig способен к связыванию CD20. В дополнительном варианте реализации

45 изобретения связывающий белок FIT-Ig способен к связыванию CD20 и другого антигена. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию CD3 и CD20. В дополнительном варианте реализации изобретения рак представляет собой В-клеточный рак. Еще в одном варианте реализации изобретения

В-клеточный рак выбран из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина, пеходжкинской лимфомы [НХЛ], лимфобластного лейкоза/лимфомы из В-клеток-предшественников, опухолей из зрелых В-клеток, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, В-клеточной лимфомы маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Бёркита, плазмацитомы, плазмноклеточной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы. В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения В-клеточного рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, причем связывающий белок FIT-Ig содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 41 или 48; и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46.

[0038] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или инфекции у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем указанный связывающий белок способен к связыванию ФНО и ИЛ-17. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig содержит последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 87, 89 и 91. В другом варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения аутоиммунного или воспалительного заболевания, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, причем указанный связывающий белок способен к связыванию ФНО и ИЛ-17, и причем аутоиммунное или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, псориаза (включая бляшечный псориаз), артрита (включая ревматоидный артрит, псориатический артрит, остеоартрит или ювенильный идиопатический артрит), множественного склероза, анкилозирующего спондилита, деформирующей артропатии, системной красной волчанки, увеита, сепсиса, нейродегенеративных заболеваний, регенерации нейронов, повреждения спинного мозга, первичного и метастатического рака, респираторного нарушения; астмы; аллергической и неаллергической астмы; астмы, вызванной инфекцией; астмы, вызванной инфекцией респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ); хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ); заболевания, характеризующегося воспалением дыхательных путей; эозинофилии; фиброза и избыточной выработки слизи; кистозного фиброза; фиброза легких; атопического заболевания; атопического дерматита; крапивницы; экземы; аллергического ринита; аллергического гастроэнтерита; воспалительного и/или аутоиммунного заболевания кожи; воспалительного и/или аутоиммунного заболевания органов желудочно-кишечного тракта; воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК); язвенного колита; воспалительного и/или аутоиммунного заболевания печени; цирроза печени; фиброза печени; и фиброза печени, вызванного вирусом гепатита В и/или С; склеродермы. В другом варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем указанный связывающий белок способен к

связыванию ФНО и ИЛ-17. В дополнительном варианте реализации изобретения рак представляет собой гепатоклеточную карциному; глиобластому; лимфому; или лимфому Ходжкина. В другом варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения инфекции у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, паразитарную инфекцию, инфекции HTLV-1. В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы подавления проявления защитных иммунных реакций типа 1 и подавления проявления защитной иммунной реакции типа 1 на протяжении вакцинации.

[0039] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения ревматоидного артрита у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, причем указанный связывающий белок содержит последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 87, 89 и 91.

[0040] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем указанный связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 и PD-1. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92, 95 и 97. В другом варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 и PD-1, и причем рак представляет собой вид рака, обычно поддающийся иммунотерапии. В другом варианте реализации изобретения рак представляет собой рак, который не был ассоциирован с иммунотерапией. В другом варианте реализации изобретения рак представляет собой рак, который представляет собой резистентную или рецидивирующую злокачественную опухоль. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок ингибирует рост или выживаемость опухолевых клеток. В другом варианте реализации изобретения рак выбран из группы, состоящей из меланомы (например, метастатическая злокачественная меланома), рака почек (например, светлоклеточная карцинома), рака предстательной железы (например, гормонорезистентная аденокарцинома предстательной железы), аденокарциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легких (например, немелкоклеточный рак легких), рака пищевода, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака печени, рака яичников, рака шейки матки, рака щитовидной железы, глиобластомы, глиомы, лейкоза, лимфомы и других злокачественных новообразований.

[0041] В одном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения меланомы у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем указанный связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 и PD-1. В дополнительном варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии предложены способы лечения или предотвращения меланомы у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, содержащего аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 92, 95 и 97.

[0042] В другом варианте реализации изобретения в настоящем раскрытии

предложены способы лечения или предотвращения инфекций или инфекционного заболевания у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту связывающего белка FIT-Ig, описанного в данном документе, причем указанный связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 и PD-1. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок FIT-Ig вводят отдельно или в комбинации с вакцинами, для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения связывающие белки, предложенные в данном документе, могут быть использованы для стимуляции иммунного ответа на вирусы, заражающие людей, такие как, в том числе, вирусы иммунодефицита человека, вирусы гепатита класса А, В и С, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус человека, вирус папилломы человека, герпесвирусы, бактерии, паразитические грибы или другие патогены.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0043] На Фигуре 1А показана структура FIT-Ig, которые состоят из трех конструкций, таких как FIT1-Ig, FIT2-Ig и FIT3-Ig. На Фигуре 1В показаны три конструкции, использованные для получения таких FIT1-Ig.

[0044] На Фигуре 2А показана основная структура FIT-Ig, которые состоят из двух конструкций. На Фигуре 2В показаны две конструкции, использованные для получения таких FIT-Ig.

[0045] На Фигуре 3 представлены результаты по биспецифическому связыванию антигенов FIT1-Ig, которые были оценены с помощью Biacore. На верхней панели Фигуры 3 показаны результаты анализа связывания с использованием Biacore, в котором сначала происходило насыщение FIT1-Ig ИЛ-17, а затем ИЛ-20. На нижней панели Фигуры 3 показаны результаты анализа с использованием Biacore, в котором сначала происходило насыщение FIT1-Ig ИЛ-20, а затем ИЛ-17.

[0046] На Фигуре 4 показана растворимость FIT Ig к ИЛ-17/ИЛ-20 или моноклонального антитела ритуксимаб при разных значениях pH, которая была оценена с помощью ПЭГ-индуцированной преципитации.

[0047] На Фигуре 5 показана стабильность развития устойчивой линии клеток CHO как в системе DG44 (5A и 5B), так и CHO-S (5C и 5D).

[0048] На Фигуре 6 показано связывание FIT10-Ig или родительских антител Ипилимумаба и Ниволумаба с CTLA-4 (6A) или PD-1 (Фигура 6B), которое было оценено с помощью ИФА.

[0049] На Фигуре 7 показаны результаты исследования множественного связывания FIT10-Ig как с CTLA-4, так и PD-1. Связывание с CTLA-4, а затем с PD-1; и связывание PD-1, а затем с CTLA-4, показаны на Фигуре 7.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0050] Настоящее изобретение относится к мультивалентным и мультиспецифическим связывающим белкам, способам получения связывающих белков и их применению в предотвращении и/или лечении острых и хронических воспалительных заболеваний, и нарушений, злокачественных новообразований и других заболеваний. Настоящее изобретение относится к мультивалентным и/или мультиспецифическим связывающим белкам, способным к связыванию двух или более антигенов. В частности, настоящее изобретение относится к иммуноглобулинам с tandemным расположением Fab-фрагментов (FIT-Ig) и их фармацевтическим композициям, а также к нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких FIT-Ig. В настоящем изобретении также охватываются способы применения FIT-Ig по настоящему изобретению для детекции специфических антигенов

либо *in vitro*, либо *in vivo*.

[0051] Новое семейство связывающих белков, предложенных в настоящем документе, способно к связыванию двух или более антигенов, например, с высокой аффинностью. В частности, в настоящем изобретении предложен подход к конструированию биспецифического связывающего белка с использованием 2 родственных моноклональных антител: мАт А, которое связывается с антигеном а; и мАт В, которое связывается с антигеном b.

[0052] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен связывающий белок, содержащий переменную область легкой цепи, специфичную по отношению к первому антигену или эпитопу, первый константный домен легкой цепи, переменную область тяжелой цепи, специфичную по отношению ко второму антигену или эпитопу, первый СН1 тяжелой цепи, переменную область тяжелой цепи, специфичную по отношению к первому антигену или эпитопу, второй СН1 тяжелой цепи, переменную область тяжелой цепи, специфичную по отношению ко второму антигену или эпитопу, и второй константный домен легкой цепи. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок дополнительно содержит Fc-область. Связывающий белок может дополнительно содержать один или более аминокислотных или полипептидных линкеров, соединяющих два или более компонентов связывающего белка. Например, связывающий белок может содержать полипептидный линкер, соединяющий переменную область легкой цепи с константной областью легкой цепи.

[0053] В одном варианте реализации изобретения в настоящем описании предложен связывающий белок, содержащий полипептидную цепь, содержащую $VL_A-CL-(X1)_n-VH_B-CH1-(X2)_n$, причем VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи мАт А, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $X1$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт В, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X2$ представляет собой Fc-область или другой домен димеризации, и n представляет собой 0 или 1.

[0054] В одном варианте реализации изобретения в настоящем изобретении предложен связывающий белок, содержащий три разные полипептидные цепи (Фигура 1), причем первая полипептидная цепь (конструкция №1) содержит $VL_A-CL-(X1)_n-VH_B-CH1-(X2)_n$, при этом VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи мАт А, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $X1$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт В, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X2$ представляет собой Fc-область или другой домен димеризации, и n представляет собой 0 или 1. Вторая полипептидная цепь (конструкция №2) содержит VH_A-CH1 , причем VH_A представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт А, и $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи. Третья полипептидная цепь (конструкция №3) содержит VL_B-CL , причем VL_B представляет собой переменный домен легкой цепи мАт В, и CL представляет собой константный домен легкой цепи.

[0055] В другом варианте реализации изобретения предложен связывающий белок, содержащий три разные полипептидные цепи с общим молекулярным дизайном, подобным предыдущему варианту реализации изобретения, за исключением того, что используется обратный порядок переменных доменов. В данном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит $VH_B-CH1-(X1)_n-VL_A-CL-(X2)_n$,

причем VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи мАт А, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $X1$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт В, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X2$ представляет собой Fc -область или другой домен димеризации, и n представляет собой 0 или 1. Вторая полипептидная цепь содержит VH_A - $CH1$, причем VH_A представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт А, и $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи. Третья полипептидная цепь содержит VL_B - CL , причем VL_B представляет собой переменный домен легкой цепи мАт В, и CL представляет собой константный домен легкой цепи.

[0056] В другом варианте реализации изобретения предложен связывающий белок, содержащий две разные полипептидные цепи (Фигура 2), причем первая полипептидная цепь (конструкция №1) содержит VL_A - CL -($X1$) n - VH_B - $CH1$ -($X2$) n , при этом VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи мАт А, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $X1$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт В, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X2$ представляет собой Fc -область или другой домен димеризации, и n представляет собой 0 или 1. Вторая полипептидная цепь (конструкция №4) содержит VH_A - $CH1$ -($X3$) n - VL_B - CL , причем VH_A представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт А, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X3$ представляет собой аминокислоту или полипептид, который является не константным доменом, и n представляет собой 0 или 1, VL_B представляет собой переменный домен легкой цепи мАт В, и CL представляет собой константный домен легкой цепи.

[0057] В другом варианте реализации изобретения предложен связывающий белок, содержащий две полипептидные цепи с общим молекулярным дизайном, подобным предыдущему варианту реализации изобретения, за исключением того, что используется обратный порядок переменных доменов. В этом варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит VH_B - $CH1$ -($X1$) n - VL_A - CL -($X2$) n , причем VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи мАт А, CL представляет собой константный домен легкой цепи, $X1$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт В, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X2$ представляет собой Fc -область или другой домен димеризации, и n представляет собой 0 или 1. Вторая полипептидная цепь содержит VL_B - CL -($X3$) n - VH_A - $CH1$, причем VH_A представляет собой переменный домен тяжелой цепи мАт А, $CH1$ представляет собой первый константный домен тяжелой цепи, $X3$ представляет собой аминокислотный или олигопептидный линкер, n представляет собой 0 или 1, VL_B представляет собой переменный домен легкой цепи мАт В, и CL представляет собой константный домен легкой цепи.

[0058] В одном варианте реализации изобретения VH - и VL -домены в связывающем белке выбраны из группы, состоящей из переменных доменов тяжелой/легкой цепей антитела мыши, переменных доменов тяжелой/легкой цепей, полностью идентичных человеческим, переменных доменов тяжелой/легкой цепей с пересадкой CDR, гуманизированных переменных доменов тяжелой/легкой цепей и их комбинаций. В

предпочтительном варианте реализации изобретения VH_A/VL_A и VH_B/VL_B способны к связыванию одинакового антигена. В другом варианте реализации изобретения VH_A/VL_A и VH_B/VL_B способны к связыванию разных антигенов.

[0059] В одном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит VL_A -CL- VH_B -CH1-Fc, и CL, а также VH_B первой полипептидной цепи непосредственно слиты друг с другом. В другом варианте реализации изобретения CL и VH_B соединены с помощью аминокислотного или олигопептидного линкера. В другом варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит VH_B -CH1- VL_A -CL-Fc, и CH1, а также VL_A непосредственно слиты друг с другом. В другом варианте реализации изобретения CH1 и VL_A соединены с помощью аминокислотного или олигопептидного линкера. В дополнительном варианте реализации изобретения олиго- или полипептидный линкер содержит 1 или более аминокислот, имеющих любую приемлемую последовательность, которая обеспечивает гибкость. Преимущественно, чтобы линкер был выбран из группы, состоящей из C,GS, SG,GGS, GSG, SGG, GGG, GGGS, SGGS, GGGGS, GGGSGS,GGGGSGS, GGGSGGS, GGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS, AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, AKTTPKLEEGEFSEARV, SAKTTP, SAKTTPKLGG, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, RADAAAA(G₄S)₄,SAKTTP, SAKTTPKLGG, S AKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVF1FPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTPLAP,AKTTAP, AKTTAPSVYPLAP,ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, GENKVEYAPALMALS,GPAKELTPLKEAKVS и GHEAAAVMQVQYPAS. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность линкера может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO. 26, 28 и 49-86. В одном варианте реализации изобретения линкер представляет собой GSG (SEQ ID NO: 26) или GGGGSGS (SEQ ID NO: 28). Линкеры также могут представлять собой расщепляемые *in vivo* пептидные линкеры, линкеры, чувствительные к протеазам (таким как MMP), линкеры на основе дисульфидной связи, которые могут расщепляться путем восстановления и т.д., как было ранее описано (Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, edited by Stefan R. Schmidt), или любые расщепляемые линкеры, известные в данной области техники. Такие расщепляемые линкеры могут быть использованы для высвобождения верхнего Fab *in vivo* для различных целей, для того чтобы улучшить проникновение и распределение тканях/клетки, усилить связывания с мишенями, уменьшить потенциальное побочное действие, а также модулировать *in vivo* функциональный и физический период полувыведения 2 разных Fab-областей. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит Fc-область. Используемый в данном документе термин «Fc-область» относится к C-концевой области тяжелой цепи IgG. Примером аминокислотной последовательности, содержащей Fc-область IgG1 человека, является SEQ ID NO: 20. Fc-область IgG содержит два константных домена, CH2 и CH3.

[0060] В одном варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой вариант Fc-области. В одном варианте реализации изобретения вариант Fc-области имеет одну или более аминокислотных модификаций, таких как замещения, деления или вставки, по сравнению с родительской Fc-областью. В дополнительном варианте реализации изобретения аминокислотные модификации Fc-области изменяют эффекторную функциональную активность по сравнению с родительской Fc-областью. Например, в одном варианте реализации изобретения вариант Fc-области может

характеризоваться измененной (т.е. повышенной или сниженной) антителозависимой цитотоксичностью (ADCC), комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), фагоцитозом, опсонизацией или связыванием клеток. В другом варианте реализации изобретения аминокислотные модификации Fc-области могут изменять (т.е. повышать или снижать) аффинность варианта Fc-области, по отношению к FcγR по сравнению с родительской Fc-областью. Например, вариант Fc-области может изменять аффинность по отношению к FcγRI, FcγRII, FcγRIII.

[0061] В одном предпочтительном варианте изобретения связывающие белки, предложенные в настоящем документе, способны к связыванию одной или более мишеней. В одном варианте реализации изобретения мишень выбрана из группы, состоящей из цитокинов, белков клеточной поверхности, ферментов и рецепторов. Предпочтительно, чтобы связывающий белок был способен модулировать биологическую функцию одной или более мишеней. Более предпочтительно, чтобы связывающий белок был способен нейтрализовать одну или более мишеней.

[0062] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию цитокинов, выбранных из группы, состоящей из лимфокинов, монокинов и полипептидных гормонов. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию пар цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-1α и ИЛ-1β; ИЛ-12 и ИЛ-18, TNFα и ИЛ-23, TNFα и ИЛ-13; TNF и ИЛ-18; TNF и ИЛ-12; TNF и ИЛ-1-бета; TNF и MIF; TNF и ИЛ-6, TNF и рецептора ИЛ-6, TNF и ИЛ-17; ИЛ-17 и ИЛ-20; ИЛ-17 и ИЛ-23; TNF и ИЛ-15; TNF и VEGF; VEGFR и EGFR; ИЛ-13 и ИЛ-9; ИЛ-13 и ИЛ-4; ИЛ-13 и ИЛ-5; ИЛ-13 и ИЛ-25; ИЛ-13 и TARC; ИЛ-13 и MDC; ИЛ-13 и MIF; ИЛ-13 и TGF-β; ИЛ-13 и агониста LHR; ИЛ-13 и CL25; ИЛ-13 и SPRR2a; ИЛ-13 и SPRR2b; ИЛ-13 и ADAM8; и TNFα и PGE4, ИЛ-13 и PED2, TNF и PEG2.

[0063] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию пар мишеней, выбранных из группы, состоящей из CD137 и CD20, CD137 и EGFR, CD137 и Her-2, CD137 и PD-1, CD 137 и PDL-1, VEGF и PD-L1, Lag-3 и TIM-3, OX40 и PD-1, TIM-3 и PD-1, TIM-3 и PDL-1, EGFR и DLL-4, VEGF и EGFR, HGF и VEGF, VEGF и VEGF (с тем же самым или другим эпитопом), VEGF и Ang2, EGFR и eMet, PDGF и VEGF, VEGF и DLL-4, OX40 и PD-L1, ICOS и PD-1, ICOS и PD-L1, Lag-3 и PD-1, Lag-3 и PD-L1, Lag-3 и CTLA-4, ICOS и CTLA-4, CD138 и CD20; CD138 и CD40; CD19 и CD20; CD20 и CD3; CD3 и CD33; CD3 и CD133; CD38 и CD138; CD38 и CD20; CD20 и CD22; CD38 и CD40; CD40 и CD20; CD47 и CD20, CD-8 и ИЛ-6; CSPG и RGM A; CTLA-4 и BTNO2; CTLA-4 и PD-1; IGF1 и IGF2; IGF 1/2 и Erb2B; IGF-1R и EGFR; EGFR и CD13; IGF-1R и ErbB3; EGFR-2 и IGFR; Her2 и Her2 (с тем же самым или другим эпитопом); Фактора IXa, Фактора X, VEGFR-2 и Met; VEGF-A и Ангиопоэтина-2 (Ang-2); ИЛ-12 и TWEAK; ИЛ-13 и ИЛ-1-бета; MAG и RGM A; NgR и RGM A; NogoA и RGM A; OMGr и RGM A; PDL-1 и CTLA-4; PD-1 и TIM-3; RGM A и RGM B; Te38 и TNFα; TNFα и Blys; TNFα и CD-22; TNFα и домена CTLA-4; TNFα и GP130; TNFα и ИЛ-12p40; и TNFα и лиганда RANK.

[0064] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 человека и ИЛ-20 человека. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 человека и ИЛ-20 человека и содержит последовательность полипептидной цепи №1 FIT-Ig, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO. 15, 25 и 27; последовательность полипептидной цепи №2, которая на

около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 21; и последовательность полипептидной цепи №3, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 23. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 человека и ИЛ-20 человека и содержит последовательность полипептидной цепи №1 FIT-Ig, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO. 15, 25 и 27; и полипептидную цепь №4, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO. 29, 30 и 31.

[0065] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию CD3 человека и CD20 человека. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок содержит последовательность полипептидной цепи №1 FIT-Ig, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO. 41 и 48; последовательность полипептидной цепи №2, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 44; и последовательность полипептидной цепи №3, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 46.

[0066] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 человека и TNF человека. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 человека и TNF человека и содержит последовательность полипептидной цепи №1 FIT-Ig, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 87; последовательность полипептидной цепи №2, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 89; и последовательность полипептидной цепи №3, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 91.

[0067] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 человека и PD-1 человека. В дополнительном варианте реализации изобретения связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 человека и PD-1 человека и содержит последовательность полипептидной цепи №1 FIT-Ig, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 92; последовательность полипептидной цепи №2, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 95; и последовательность полипептидной цепи №3, которая на около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или 100% идентична SEQ ID NO. 97.

[0068] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию одного или двух цитокинов, белков, родственных цитокинам, и рецепторов цитокинов, выбранных из группы, состоящей из BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGFU, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNG, IFNW1,

FIL1, FIL1 (EPSILON), FIL1 (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ7, ИЛ8, ИЛ9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, ИЛ-17, ИЛ-17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, ROR1, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L, A2aR, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-
 5 H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70, CD40, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (ФНО-b), LTb, TNF (ФНО-a), TNFSF4 (лиганд OX40), TNFSF5 (лиганд CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (лиганд CD27), TNFSF8 (лиганд CD30), TNFSF9 (лиганд 4-1BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, FIGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, ИЛ1R1,
 10 ИЛ1R2, ИЛ1RL1, ИЛ1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, ИЛ5RA, ИЛ6R, ИЛ7R, ИЛ8RA, ИЛ8RB, ИЛ9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, ИЛ-17Я, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, ИЛ6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (лептин), PTN и THPO.

[0069] Связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию
 15 одного или более хемокинов, рецепторов хемокинов и белков, родственных хемокинам, выбранных из группы, состоящей из CCL1 (I-309), CCL2 (MCP -1 / MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mep-2), CCL11 (эотаксин), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/эксодин-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-
 20 1), CCL24 (MPIF-2/эотаксин-2), CCL25 (TECK), CCL26 (эотаксин-3), CCL27 (STACK/ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (лимфотактин), XCL2 (SCM-1b), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6 / JAB61), CCR1 (CKR1 / HM145), CCR2 (mep-
 25 1RB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EBI1), CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5 / CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR / STRL33 / Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTb4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6,
 30 CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HIF1A, IL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2 и VHL.

[0070] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию белка клеточной поверхности, такого как,
 35 например, интегрины. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию ферментов, выбранных из группы, состоящей из киназ и протсаз. Еще в одном варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению способен к связыванию рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов лимфокинов, рецепторов монокинов
 40 и рецепторов полипептидных гормонов.

[0071] В одном варианте реализации изобретения связывающий белок является мультивалентным. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок является мультиспецифическим. Мультивалентные и/или мультиспецифические связывающие белки, описанные выше, обладают желательными свойствами, в частности,
 45 с терапевтической точки зрения. Например, мультивалентный и/или мультиспецифический связывающий белок может (1) быть интернализован (и/или катаболизирован) быстрее, чем бивалентное антитело клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела; (2) быть антителом-агонистом; и/или (3)

индуцировать некроз и/или апоптоз клетки, экспрессирующей антиген, с которым способно связываться мультивалентное антитело. «Родительское антитело», которое обладает по меньшей мере одной антигенсвязывающей специфичностью, характерной для мультивалентных и/или мультиспецифических связывающих белков, может быть антителом, которое интернализуется (и/или катаболизируется) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связывается антитело; и/или может быть агонистом, антителом, индуцирующим некроз и/или индуцирующим апоптоз клетки, и одно или более из указанных свойств мультивалентного и/или мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе, может (могут) быть улучшено (улучшены).

Более того, родительское антитело может быть лишено любого одного или более из этих свойств, но может быть наделено ими при конструировании в виде мультивалентного связывающего белка, описанного в данном документе.

[0072] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок по настоящему изобретению имеет константу скорости ассоциации (K_{on}) по отношению к одной или более мишеней, выбранную из группы, состоящей из значений указанной константы, составляющих: по меньшей мере около $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере около $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере около $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; по меньшей мере около $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; и по меньшей мере около $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ по результатам измерений поверхностного плазмонного резонанса.

Предпочтительно, чтобы связывающий белок по настоящему изобретению имел константу скорости ассоциации (K_{on}) по отношению к одной или более мишеней, составляющую от $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ до $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; от $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ до $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; от $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ до $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; или от $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ до $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ по результатам измерений поверхностного плазмонного резонанса.

[0073] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок имеет константу скорости диссоциации (K_{off}) по отношению к одной или более мишеней, выбранную из группы, состоящей из значений указанной константы, составляющих: не более чем 10^{-3}s^{-1} ; не более чем 10^{-4}s^{-1} ; не более чем 10^{-5}s^{-1} ; и не более чем 10^{-6}s^{-1} по результатам измерений поверхностного плазмонного резонанса. Предпочтительно, чтобы связывающий белок по настоящему изобретению имел константу скорости диссоциации (K_{off}) по отношению к одной или более мишеней, составляющую от 10^{-3}s^{-1} до 10^{-4}s^{-1} ; от 10^{-4}s^{-1} до 10^{-5}s^{-1} ; или от 10^{-5}s^{-1} до 10^{-6}s^{-1} по результатам измерений поверхностного плазмонного резонанса.

[0074] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок имеет константу диссоциации (K_D) по отношению к одной или более мишеней, выбранную из группы, состоящей из значений указанной константы, составляющих: не более чем, около 10^{-7}M ; не более чем около 10^{-8}M ; не более чем около 10^{-9}M ; не более чем около 10^{-10}M ; не более чем около 10^{-11}M ; не более чем около 10^{-12}M ; и не более чем 10^{-13}M по результатам измерения поверхностного плазмонного резонанса. Предпочтительно, чтобы связывающий белок по настоящему изобретению имел константу диссоциации (K_D) по отношению к ИЛ-12 или ИЛ-23 от 10^{-7}M до 10^{-8}M ; от 10^{-8}M до 10^{-9}M ; от 10^{-9}M до 10^{-10}M ; от 10^{-10}M до 10^{-11}M ; от 10^{-11}M до 10^{-12}M ; или от 10^{-12}M до 10^{-13}M .

[0075] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок, описанный выше, представляет собой конъюгат, дополнительно содержащий средство, выбранное из группы, состоящей из иммуноадгезивной молекулы, средства для визуализации,

терапевтического средства и цитотоксического средства. В одном варианте реализации изобретения средство для визуализации выбрано из группы, состоящей из радиоактивной метки, фермента, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолуминесцентной метки, магнитной метки и биотина. В дополнительном варианте реализации изобретения средством для визуализации является радиоактивная метка, выбранная из группы, состоящей из: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho и ^{153}Sm . В одном варианте реализации изобретения терапевтическое или цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из иммунодепрессанта, иммуностимулятора, антиметаболита, алкилирующего средства, антибиотика, фактора роста, цитокина, антиангиогенного средства, антимиотического средства, антрациклина, токсина и апоптического средства. В одном варианте реализации изобретения связывающий белок непосредственно конъюгирован с указанным средством. В другом варианте реализации изобретения связывающий белок конъюгирован со средством с помощью линкера. Подходящие линкеры включают, в том числе, аминокислотные и полипептидные линкеры, описанные в данном документе. Линкеры могут быть расщепляемыми или не расщепляемыми.

[0076] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок, описанный выше, представляет собой кристаллический связывающий белок и существует в кристаллической форме. Предпочтительно, чтобы кристаллическая форма представляла собой фармацевтический препарат в кристаллической форме без вспомогательных веществ с контролируемым высвобождением. Более предпочтительно, чтобы кристаллический связывающий белок имел больший период полувыведения *in vivo*, чем растворимый аналог указанного связывающего белка. Более предпочтительно, чтобы кристаллический связывающий белок сохранял биологическую активность.

[0077] В другом варианте реализации изобретения связывающий белок, описанный выше, является гликозилированным. Предпочтительно, чтобы белок имел профиль гликозилирования, характерный для человека.

[0078] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей любой из связывающих белков, описанных выше. В дополнительном варианте реализации изобретения предложен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, описанную выше, причем указанный вектор выбран из группы, состоящей из pcDNA; pTT (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2); pTT3 (pTT с дополнительным сайтом множественного клонирования; pEFBOS (Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO и pBJ. Предложены мультиспецифические связывающие белки и такие же способы их получения. Связывающий белок можно получить с использованием различных методов. В данном описании приведены экспрессирующие векторы, клетки-хозяева и способы получения связывающих белков.

[0079] Антигенсвязывающие переменные домены связывающих белков по настоящему изобретению можно получить из родительских связывающих белков, включая поликлональные Ат, моноклональные Ат и/или рецепторы, способные к связыванию представляющих интерес антигенов. Эти родительские связывающие белки могут быть природного происхождения или могут быть получены с помощью рекомбинантной технологии. Специалист в данной области техники хорошо знаком со многими способами получения антител и/или выделенных рецепторов, включая, в том числе, использование гибридомной технологии, метода получения антител с помощью селекции отдельных специфических лимфоцитов (selected lymphocyte antibody method, SLAM), применение фагового, дрожжевого дисплея или дисплея слитых молекул РНК-

белка (RNA-protein fusion display) или другой библиотеки, иммунизацию животного, отличного от человека, содержащего по меньшей мере некоторые из локусов иммуноглобулина человека и получение рекомбинантных антител с пересаженными CDR-участками и гуманизированных антител. См., например, публикацию патента США №20090311253 A1. Варибельные домены также могут быть получены с использованием методов созреваания аффинности. Связывающие варибельные домены связывающих белков также могут быть получены из выделенных рецепторных молекул, полученных методами экстракции, известными в данной области техники (например, с использованием растворителей, детергентов и/или методов аффинной очистки), или могут быть обнаружены с использованием биофизических методов, известных в данной области техники (например, рентгенокристаллография, ЯМР, интерферометрия и/или компьютерное моделирование).

[0080] Один вариант реализации изобретения включает селекцию родительских связывающих белков, обладающих по меньшей мере одним или более свойствами, желательными для связывающей белковой молекулы. В одном варианте реализации изобретения желательное свойство представляет собой одно или более из свойств, используемых для характеристики параметров антител, такое как, например, антигенная специфичность, аффинность по отношению к антигену, активность, биологическая функция, распознавание эпитопов, стабильность, растворимость, эффективность производства, иммуногенность, фармакокинетика, биодоступность, перекрестная тканевая реактивность или связывание ортологического антигена. См., например, публикацию патента США №20090311253.

[0081] Мультиспецифические антитела также могут быть сконструированы таким образом, что один или более антигенсвязывающих доменов окажется нефункциональным. Варибельные домены можно получить с использованием технологий рекомбинантных ДНК из родительских связывающих белков, полученных любым из способов, описанных в данном документе. В одном варианте реализации изобретения варибельный домен представляет собой варибельный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина мыши. В другом варианте реализации изобретения варибельный домен представляет собой варибельный домен с пересаженными CDR-участками или гуманизированный варибельный домен тяжелой или легкой цепи. В одном варианте реализации изобретения варибельный домен представляет собой варибельный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина человека.

[0082] В одном варианте реализации изобретения один или более константных доменов связаны с варибельными доменами с использованием технологий рекомбинантной ДНК. В одном варианте реализации изобретения последовательность, содержащая один или более варибельных доменов тяжелой цепи, связана с константным доменом тяжелой цепи, а последовательность, содержащая один или более варибельных доменов легкой цепи, связана с константным доменом легкой цепи. В одном варианте реализации изобретения константные домены представлены человеческими константными доменами тяжелой цепи и человеческими константными доменами легкой цепи, соответственно. В одном варианте реализации изобретения тяжелая цепь дополнительно связана с Fc-областью. Fc-область может представлять собой Fc-область с нативной последовательностью или вариант Fc-области. В другом варианте реализации изобретения Fc-область представляет собой Fc-область иммуноглобулина человека. В другом варианте реализации изобретения Fc-область включает Fc-область из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, или IgD.

[0083] В дополнение к этому, связывающие белки, предложенные в настоящем

документе, могут использоваться для тканеспецифической доставки могут быть использованы для тканеспецифической доставки (направленной на тканевые маркеры и медиаторы воспалительного процесса для улучшения локальных фармакокинетических показателей, а следовательно и более высокой эффективности и/или низкой токсичности),

- 5 включая внутриклеточную доставку (направленную на рецептор трансферрина и медиатор заболевания ЦНС для пересечения гематоэнцефалического барьера). Связывающие белки также могут послужить в качестве белка-носителя для доставки антигена в специфическое местоположение посредством связывания с ненейтрализующим эпитопом данного антигена, а также для увеличения периода полувыведения антигена.
- 10 Кроме того, связывающие белки могут быть сконструированы либо для физического связывания с медицинскими устройствами, имплантируемыми пациентам, либо для направленного взаимодействия с этими медицинскими устройствами (см. Burke et al. (2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58(3): 437-446; Hildebrand et al. (2006) *Surface and Coatings Technol.* 200(22-23): 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) *Biomaterials* 27(11):2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices, Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397). Направление подходящих типов клеток к сайту локализации
- 15 медицинского имплантата может стимулировать заживление и восстановление нормальной функции ткани. В качестве альтернативы, также предложено ингибирование медиаторов (включая, в том числе, цитокины), высвобождаемых после имплантации устройства, посредством слитого белка, состоящего из антитела и рецептора, нанесенного на устройство или направленно связанного с устройством.

- [0084] В одном аспекте клетку-хозяина трансформируют вектором, описанным выше. В одном варианте реализации изобретения клеткой-хозяином является прокариотическая
- 25 клетка. В дополнительном варианте реализации изобретения клеткой-хозяином является *Escheresia coli*. В другом варианте реализации изобретения клеткой-хозяином является эукариотическая клетка. В дополнительном варианте реализации изобретения эукариотическая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки одноклеточного организма, клетки животного, клетки растения и клетки гриба. В одном варианте
- 30 реализации изобретения клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, включая, в том числе, 293, COS, NS0 и CHO, и/или клетка гриба, такая как *Saccharomyces cerevisiae*; или клетка насекомого, такая как Sf9.

- [0085] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения связывающего белка, описанного выше, включающий культивирование любой из
- 35 клеток-хозяев, также описанных выше, в культуральной среде в условиях, достаточных для выработки связывающего белка. Предпочтительно 50%-75% связывающего белка, получаемого указанным способом, приходится на четырехвалентный связывающий белок с двойной специфичностью. Более предпочтительно 75%-90% связывающего
- 40 связывающий белок с двойной специфичностью. Более предпочтительно 90%-95% связывающего белка, получаемого указанным способом, приходится на четырехвалентный связывающий белок с двойной специфичностью.

[0086] В другом варианте настоящего изобретения предложен связывающий белок, полученный в соответствии с описанным выше способом.

- 45 [0087] В одном варианте настоящего изобретения предложена композиция для высвобождения связывающего белка, причем композиция содержит лекарственную форму, которая, в свою очередь, содержит кристаллический связывающий белок, который описан выше, и ингредиент; и по меньшей мере один полимерный носитель.

Предпочтительно полимерным носителем является полимер, выбранный из одной или более группы, состоящей из: поли (акриловой кислоты), поли (цианоакрилатов), поли (аминокислот), поли (ангидридов), поли (депсипептидов), поли (сложных эфиров), поли (молочной кислоты), сополимера молочной и гликолевой кислот или PLGA, поли (b-гидроксibuтирата), поли (капролактона), поли (диоксанона); поли (этиленгликоля), поли (гидроксипропил) метакриламида, поли [(органo)фосфацепа], поли (сложных ортоэфиров), поли (винилового спирта), поли (винилпирролидона), сополимеров малеипового ангидрида и алкилвинилового эфира, полиолов плуроников, альбумина, альгината, целлюлозы и производных целлюлозы, коллагена, фибрина, желатина, гиалуроновой кислоты, олигосахаридов, гликаминогликанов, сульфатированных полисахаридов, их смесей и сополимеров. Предпочтительно ингредиент выбран из группы, состоящей из альбумина, сахарозы, трегалозы, лактита, желатина, гидроксипропил-β-циклодекетрина, метоксиполиэтиленгликоля и полиэтиленгликоля. В другом варианте реализации изобретения предложен способ лечения млекопитающего, включающий стадию введения млекопитающему эффективного количества композиции, описанной выше.

[0088] В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая связывающий белок, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители, включают, в том числе, фосфатный буфер или солевой раствор. Другие общепринятые носители для парентеральных препаратов включают растворы фосфата натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом, или жирные масла. Носители для внутривенных препаратов включают жидкость и добавки питательных веществ, добавки электролитов, такие как лежащие в основе раствора Рингера с декстрозой, и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные вещества, антиоксиданты, хелатирующие вещества и инертные газы и тому подобное. Конкретнее, фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед употреблением. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. В некоторых случаях в композицию предпочтительно включить изотонические вещества, например, сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбитол или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться за счет включения в композицию средства, которое задерживает всасывание, например, моностеарат алюминия и желатин.

[0089] В дополнительном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для лечения нарушения. В одном варианте реализации изобретения дополнительное средство выбрано из группы, состоящей из: терапевтических средств, средств для визуализации, цитотоксического средства, ингибиторов ангиогенеза (включая, в том числе, антитела к VEGF антитела или белок-ловушка для VEGF); ингибиторов киназ (включая, в том числе, ингибиторы KDR и TIE-2); блокаторов костимулирующих молекул (включая, в том числе, антитела к B7.1, B7.2, CTLA4-Ig, PD-1, CD20); блокаторов молекул адгезии (включая, в том числе, Ат к LFA-1, Ат к E/L селектину, низкомолекулярные ингибиторы); антитела к цитокину или его функциональных фрагментов (включая, в

том числе, антитела к ИЛ-18, ФНО, антитела к рецептору цитокина ИЛ-6); метотрексата; циклоспорина; рапамицина; FK506; детектируемой метки или репортера; антагониста ФНО; противоревматического средства; миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID),

5 аналгезирующего средства, анестезирующего средства, седативного средства, местного анестезирующего средства, нервно-мышечного блокатора, противомикробного агента, антипсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта, гормона роста, гормонзаместительного лекарственного средства, радиофармацевтического средства, 10 антидепрессанта, антипсихотического средства, стимулятора, противоастматического средства, бета-агониста, ингалируемого стероида, эпинефрина или его аналога, цитокина и антагониста цитокина.

[0090] В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, страдающего нарушением, причиняемым мишенью(-ями), которая(-ые) может 15 (-гут) связываться с вышеописанным белком, оказывают негативное влияние, предусматривающий введение этому субъекту описанного выше связывающего белка таким образом, чтобы ингибировать активность мишени или мишеней у субъекта и вылечить или предотвратить нарушение. В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание, 20 аутоиммунное заболевание или злокачественное новообразование. В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из артрита, остеоартрита, хронического ювенильного артрита, септического артрита, артрита Лайма, псориазического артрита, реактивного артрита, спондилоартропатии, системной красной волчанки, болезни Крона, язвенного колита, воспалительного 25 заболевания кишечника, инсулинозависимого сахарного диабета, тиреоидита, астмы, аллергических заболеваний, псориаза, дерматита, склеродермии, болезни трансплантат против хозяина, отторжения трансплантатов органов, острого или хронического иммунного заболевания, ассоциированного с трансплантацией органов, саркоидоза, атеросклероза, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, болезни Кавасаки, 30 болезни Грейвса, нефротического синдрома, синдрома хронической усталости, гранулематоза Вегенера, пурпуры Геноха-Шенлейна, микроскопического васкулита почек, хронического активного гепатита, увеита, септического шока, синдрома токсического шока, синдрома сепсиса, кахексии, инфекционных заболеваний, паразитарных заболеваний, синдрома приобретенного иммунодефицита, острого 35 поперечного миелита, хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, инсульта, первичного билиарного цирроза, гемолитической анемии, злокачественных заболеваний, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, болезни Аддисона, спорадической плюригландулярной недостаточности типа I и плюригландулярной недостаточности типа II, синдрома Шмидта, (острого) респираторного дистресс- 40 синдрома взрослых, алопеции, гнездной (очаговой) алопеции, серонегативной артропатии, артропатии, болезни Рейтера, псориазической артропатии, артропатии язвенного колита, энтеропатического синовита, ассоциированной с Chlamydia, Yersinia и Salmonella артропатии, спондилоартропатии, атероматозного заболевания/артериосклероза, агонической аллергии, аутоиммунного буллезного заболевания, 45 пузырчатки обыкновенной, листовидной пузырьчатки, немфигоида, линейного IgA-заболевания, аутоиммунной гемолитической анемии, положительной гемолитической анемии Кумбса, приобретенной пернициозной анемии, ювенильной пернициозной анемии, миалгического энцефалита/британского миалгического энцефалита,

хронического кожно-слизистого кандидоза, гигантоклеточного артериита, первичного склерозирующего гепатита, криптогенного аутоиммунного гепатита, синдрома приобретенного иммунодефицита, заболеваний, родственных приобретенному иммунодефициту, гепатита В, гепатита С, общего транзиторного иммунодефицита (общей транзиторной гипогаммаглобулинемии), дилатационной кардиомиопатии, женского бесплодия, угасания функции яичников, преждевременного угасания функции яичников, фибротического заболевания легких, криптогенного фиброзирующего альвеолита, постлевосталительного интерстициального заболевания легких, интерстициального пневмонита, ассоциированной с болезнью соединительной ткани

интерстициальной болезни легких, ассоциированной с болезнью смешанной соединительной ткани болезни легких, ассоциированной с системным склерозом интерстициальной болезни легких, ассоциированной с ревматоидным артритом интерстициальной болезни легких, ассоциированной с системной красной волчанкой болезни легких, ассоциированной с дерматомиозитом/полимиозитом болезни легких, ассоциированной с болезнью Шегрена болезни легких, ассоциированной с анкилозирующим спондилитом болезни легких, васкулитной диффузной болезни легких, ассоциированной с гемосидерозом болезни легких, индуцированной лекарственным средством интерстициальной болезни легких, фиброза, лучевого фиброза, облитерирующего бронхиолита, хронической эозинофильной пневмонии,

лимфоцитарного инфильтративного заболевания легких, постинфекционного интерстициального заболевания легких, подагрического артрита, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного гепатита типа-1 (классического аутоиммунного или люноидного гепатита), аутоиммунного гепатита типа-2 (гепатита с антителами к LKM), аутоиммунно опосредованной гипогликемии, инсулинорезистентности типа В с

папиллярно-пигментной дистрофией кожи (acanthosis nigricans), гипопаратиреоза, острого иммунного заболевания, ассоциированного с трансплантацией органа, хронического иммунного заболевания, ассоциированного с трансплантацией органа, остеоартроза, первичного склерозирующего холангита, псориаза типа 1, псориаза типа 2, идиопатической лейкопении, аутоиммунной нейтропении, почечного заболевания NOS (БДУ), гломерулонефрита, микроскопического васкулита почек, болезни Лайма, дискоидной красной волчанки, мужского бесплодия идиопатического или NOS (БДУ), аутоиммуности спермы, множественного склероза (всех подтипов), симпатической офтальмии, легочной гипертензии, вторичной относительно заболевания соединительной ткани, синдрома Гудпасчера, легочной манифестации нодозного полиартериита, острой ревматической лихорадки, ревматоидного спондилита, болезни Стилла, системного склероза, синдрома Шегрена, болезни Такаясу/артериита, аутоиммунной тромбоцитопении, идиопатической тромбоцитопении, аутоиммунного заболевания щитовидной железы, гипертиреоза, зобного аутоиммунного гипотиреоза (болезни Хашимото), атрофического аутоиммунного гипотиреоза, первичной микседемы,

факогенного увеита, первичного васкулита, витилиго, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, алкогольного цирроза, индуцированного алкоголем повреждения печени, холестаза, идиосинкратической болезни печени, индуцированного лекарственным средством гепатита, неалкогольного стеатогепатита, аллергии и астмы, стрептококковой инфекции группы В (GBS), психических нарушений (например, депрессии и шизофрении), Th типа 2- и Th типа 1-опосредованных заболеваний, острой и хронической боли (различных форм боли) и раковых заболеваний, таких как рак легкого, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, ободочной кишки, поджелудочной железы, яичников, предстательной железы и прямой кишки, и

гемопоэтических злокачественных заболеваний (лейкоза и лимфомы), абеталипопротеинемии, акроцианоза, острых и хронических паразитарных или инфекционных процессов, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), острой или хронической бактериальной инфекции, 5 острого панкреатита, острой почечной недостаточности, аденокарцином, предсердных эктопических систол, комплекса СПИД-деменция, индуцированного алкоголем гепатита, аллергического конъюнктивита, аллергического контактного дерматита, аллергического ринита, отторжения аллотрансплантата, недостаточности альфа-1-антитрипсина, амиотрофического бокового склероза, анемии, стенокардии, дегенерации клеток 10 переднего рога спинного мозга, терапии антителами к cd3, антифосфолипидного синдрома, аллергических реакций на противорецепторные антитела, аневризмы аорты и периферических сосудов, рассечения аорты, артериальной гипертензии, артериосклероза, атриовентрикулярной фистулы, атаксии, предсердной фибрилляции (стойкой или пароксизмальной), трепетания предсердий, атриовентрикулярной блокады, 15 В-клеточной лимфомы, отторжения костного трансплантата, отторжения трансплантата костного мозга (ВМТ), межжелудочковой блокады, лимфомы Беркитта, ожогов, сердечных аритмий, синдрома временной остановки сердца, опухолей сердца, кардиомиопатии, воспалительной реакции при искусственном кровообращении, отторжения трансплантата хряща, церебеллярных кортикальных дегенерации, 20 церебеллярных нарушений, хаотической или мультиочаговой предсердной тахикардии, ассоциированных с химиотерапией нарушений, хронического миелоцитарного лейкоза (СМЛ), хронического алкоголизма, хронических воспалительных патологий, хронического лимфоцитарного лейкоза (СLL), хронической обструктивной болезни легких (СOPD), хронической интоксикации салицилатом, рака ободочной кишки, 25 застойной сердечной недостаточности, конъюнктивита, контактного дерматита, легочного сердца, болезни коронарных артерий, болезни Крейтцфельда-Якоба, отрицательного в культуре сепсиса, муковисцидоза, ассоциированных с терапией цитокинами нарушений, боксерской деменции, демиелинизирующих заболеваний, геморрагической лихорадки Денге, дерматита, дерматологических состояний, диабета, 30 сахарного диабета, диабетического артериосклеротического заболевания, заболевания с диффузными тельцами Леви, дилатационной застойной кардиомиопатии, нарушений базальных (подкорковых) ядер головного мозга, синдрома Дауна в среднем возрасте, индуцированных лекарственными средствами нарушений движения, нарушений, индуцированных лекарственными средствами, которые блокируют рецепторы дофамина 35 ЦНС, чувствительности к лекарственным средствам, экземы, энцефаломиелита, эндокардита, эндокринопатии, эпиглоттита, инфекции вирусом Эпштейна-Барр, эритроцитопении, экстрапирамидных и церебеллярных нарушений, семейного гематофагоцитарного лимфоцитарного гистиоцитоза, отторжения имплантата фетальной вилочковой железы, атаксии Фридрейха, функциональных периферических артериальных 40 нарушений, грибкового сепсиса, газовой (анаэробной) гангрены, язвы желудка, гломерулонефрита, отторжения трансплантата любого органа или любой ткани, грамотрицательного сепсиса, грамположительного сепсиса, гранулем, вызываемых внутриклеточными организмами, лейкемического ретикулоэндотелиоза, болезни Халлеррордена-Шнатца, тиреоидита Хашимото, сенной лихорадки, отторжения 45 трансплантата сердца, гемохроматоза, гемодиализа, гемолитического уремического синдрома/тромботической тромбоцитопенической пурпуры, кровотечения, гепатита (А), аритмии пучка Гиса, ВИЧ-инфекции/ВИЧ-невропатии, болезни Ходжкина, гиперкинетических нарушений движения, аллергических реакций, аллергического

пневмонита, гипертензии, гипокинетических нарушений движения, диагностики системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники, идиопатической болезни Аддисона, идиопатического легочного фиброза, опосредованной антителами цитотоксичности, астении, детской спинально-мышечной атрофии, воспаления аорты, гриппа А, воздействия ионизирующей радиацией, иридоциклита/увеита/неврита зрительного нерва, ишемического/реперфузионного повреждения, ишемического инсульта, ювенильного ревматоидного артрита, ювенильной спинально-мышечной атрофии, саркомы Капоши, отторжения трансплантата почки, инфекций микобактерией *Legionella*, лейшманиоза, проказы, повреждений кортикоспинальной системы, жирового отека, отторжения трансплантата печени, лимфатического отека, малярии, злокачественной лимфомы, злокачественного гистиоцитоза, злокачественной меланомы, менингита, менингококкемии, метаболической/идиопатической, кластерной головной боли, митохондриального мультисистемного нарушения, заболевания смешанной соединительной ткани, моноклональной гаммопатии, множественной миеломы, дегенерации множественных систем (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager и Machado-Joseph), тяжелой псевдопаралитической миастении, *Mycobacterium avium intracellulare*, туберкулезной бациллы, синдрома мислодисплазии, инфаркта миокарда, ишемических нарушений миокарда, рака носоглотки, хронического заболевания легких новорожденных, нефрита, нефроза, нейродегенеративных заболеваний, пейрогенных мышечных атрофии, нейрогенной лихорадки, неходжкинской лимфомы, закупорки брюшной аорты и ее ответвлений, окклюзивных артериальных нарушений, окт3-терапии, орхита/эпидидимита, процедур после лечения орхита/вазэктомии, органомегалии, остеопороза, отторжения трансплантата поджелудочной железы, рака поджелудочной железы, паранеопластического синдрома/гиперкальциемии при злокачественных заболеваниях, отторжения трансплантата паращитовидной железы, воспалительного заболевания почечных лоханок, круглогодичного ринита, заболевания перикарда, периферического атеросклеротического заболевания, периферических васкулярных нарушений, перитонита, пернициозной анемии, пневмонии, вызываемой *Pneumocystis carinii*, пневмонии, синдрома POEMS (полиневропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммопатии и синдрома изменений кожи), постреперфузионного синдрома, постгемодиализного синдрома, синдрома пост-МІ-кардиотомии, пре-эклампсии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, первичной легочной гипертензии, лучевой терапии, феномена и болезни Рейно, болезни Рейно, болезни Рефсума, тахикардии с регулярными узкими QRS, реноваскулярной (почечно-сосудистой) гипертензии, реперфузионного повреждения, рестриктивной кардиомиопатии, сарком, склеродермии, сенильной хореи, сенильной деменции, ассоциированной с тельцами Леви, сероотрицательных артропатий, шока, серповидно-клеточной анемии, отторжения аллотрансплантата кожи, синдрома изменений кожи, отторжения трансплантата тонкой кишки, солидных опухолей, специфических аритмий, спинальной атаксии, спинально-церебеллярных дегенерации, стрептококкового миозита, структурных повреждений мозжечка, подострого склерозирующего панэнцефалита, обморока (синкопе), сердечно-сосудистого сифилиса, системной анафилаксии, синдрома системной воспалительной реакции, системного ювенильного ревматоидного артрита, Т-клеточного или FAB ALL (острого лимфобластного лейкоза), телеангиэктазии, облитерирующего тромбоангиита, тромбоцитопении, токсичности, трансплантатов, травмы/кровотечения, аллергических реакций типа III, аллергии типа IV, нестабильной стенокардии, уремии, уросепсиса, крапивницы, вальвулярных сердечных заболеваний, варикозных вен, васкулита, венозных заболеваний, венозного тромбоза, фибрилляции (мерцания) желудочков,

вирусных и грибковых инфекций, острого энцефалита с высоким риском смертельного исхода/асептического менингита, гемафагоцитарного синдрома, ассоциированного с высоким риском смертельного исхода, синдрома Вернике-Корсакова, заболевания Вильсона, отторжения ксенотрансплантата любого органа или любой ткани.

5 [0091] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, страдающего от нарушения, предусматривающий стадию введения любого из описанных выше связывающих белков, до, одновременно, или после введения второго средства, как обсуждалось выше. В предпочтительном варианте настоящего изобретения второе средство выбрано из группы, состоящей из буденозида, эпидермального фактора роста, 10 кортикостероидов, циклоспорина, сульфасалазина, аминосалицилатов, 6-меркаптопурина, азатиоприна, метронидазола, ингибиторов липоксигеназы, месаламина, олсалазина, балсалазида, антиоксидантов, ингибиторов тромбксана, антагонистов рецептора ИЛ-1, моноклональных антител к ИЛ-1 β , моноклональных антител к ИЛ-6, факторов роста, ингибиторов эластазы, пиридинилимидазольных соединений, антител 15 или агонистов TNF, LT, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18, ИЛ-23, ЕМАР-II, GM-CSF, FGF и PDGF, антител CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандов, метотрексата, циклоспорина, FK506, рапамицина, микофенолята мофетила, лефлуномида, NSAID, ибупрофена, кортикостероидов, преднизолона, ингибиторов фосфодиэстеразы, 20 агонистов аденозина, антитромботических агентов, ингибиторов комплемента, адренергических агентов, IRAK, NIK, IKK, p38, ингибиторов MAP-киназы, ингибиторов ИЛ-1 β -превращающего фермента, ингибиторов TNF α -превращающего фермента, ингибиторов передачи сигнала Т-клеток, ингибиторов металлопротейназы, сульфасалазина, азатиоприна, 6-меркаптопуринов, ингибиторов ангиотензин- 25 превращающего фермента, растворимых рецепторов цитокинов, растворимого рецептора TNF p55, растворимого рецептора TNF p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-13 и TGF β .

[0092] В одном варианте реализации изобретения фармацевтические композиции, описанные выше, вводят субъекту по меньшей мере одним способом, выбранным из 30 парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, интракапсулярного, внутривисцерального, внутриполостного, внутриклеточного, интрацеребеллярного, интрацеребровентрикулярного, внутрикишечного, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, 35 внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, внутриплеврального, внутрипростатического, внутрилегочного, интаректального, интаренального, интаретинального, интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, интравезикулярного, болюсного, вагинального, ректального, буккального, сублингвального, интраназального и трансдермального способов.

40 [0093] В одном аспекте настоящего изобретения предложено по меньшей мере одно антиидиотипическое антитело по меньшей мере для одного связывающего белка настоящего изобретения. Это антиидиотипическое антитело включает в себя любую содержащую белок или пептид молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере один 45 определяющий комплементарность участок (CDR) тяжелой или легкой цепи или его связывающую лиганд часть, вариабельный район тяжелой цепи или легкой цепи, константный район тяжелой цепи или легкой цепи, каркасный район или любую их часть, которые могут быть включены в связывающий белок по настоящему изобретению.

[0094] В другом варианте реализации изобретения связывающие белки настоящего изобретение способны связывать одну или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; агрекан; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (цинк-а-гликопротеин); B7.1; B7.2; BAD; BAFF; BAG1; BAT1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLR1 (MDR15); BlyS; BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (плектин); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6 / JAB61); CCL1 (1-309); CCL11 (эотаксин); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-1d); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MIP-2); SLC; эксодуса-2; CCL22 (MDC / STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2 / эотаксин -2); CCL25 (TECK); CCL26 (эотаксин-3); CCL27 (CTACK / ILC); CCL28; CCL3 (MIP-1a); CCL4 (MP-1b); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1 / HM145); CCR2 (mcp-1RB / RA); CCR3 (CKR3 / CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5 / ChemR13); CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6); CCR7 (CKR7 / EBI1); CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD-22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD47; CD48; CD52; CD69; CD70; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CD137; CD138; B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CDH1 (Е-кадгерин); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21Wap1/Cip1); CDKN1B (p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A (p16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; хитиназы; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (клаудин-7); CLN3; CLU (кластерин); CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA-4; CTNNB1 (б-катенин); CTSB (катепсин В); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (1-TAC / 1P-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78 / LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR / STRL33 / Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB21P; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF 14; FGF 16; FGF 17; FGF 18; FGF 19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; F1GF (VEGFD); FTL1 (EPSILON); FTL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (фибронектин); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GAT A3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (гелсолин); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HIP1; гистамина и рецепторов гистамина; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN- α ; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFNгамма; IFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; ИЛ-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; ИЛ-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; ИЛ-17; ИЛ-17 B; ИЛ-17C; RH-17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1RI; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2 IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23;

IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (гликопротеин 130); IL7; IL7R; IL8; IL8RA; IL8RB; IL8RB; IL9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (интегрин α6); TTGAV; ITGB3; ITGB4 (интегрин β4); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KTTLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (кератин 19); KRT2A; KRTHB6 (специфический для волос кератин типа 11); LAMA5; LEP (лептин); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (ФНО-β); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG или Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; мидкин; MIF; MIP-2; MKI67 (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (металлотионин-III); MTSS1; MUC1 (муцин); MYC; MYD88; NCK2; нейрокапа; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NR0B1; NR0B2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; PCSK9; P2RX7; PAP; PARTI; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PD-I; PD-L1; α4β7, OX40, GITR, TIM-3, Lag-3, B7-H3, B7-H4, GDF8, CGRP, Lingo-1, Фактор IXa, Фактор X, ICOS, GARP, BTLA, CD160, ROR1, 2B4, KIR, CD27, OX40, CD40L, A2aR, PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; фосфокана; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (P21Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROB02; S100A2; SCGB1D2 (липофилин B); SCGB2A1 (маммаглобин 2); SCGB2A2 (маммаглобин 1); SCYE1 (эндотелиальный моноцит-активирующий цитокин); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5 (маспин); SERPINE1 (PAI-1); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB 1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP 10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGFB2; TGFB3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (тромбоспондин-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TIMP3; фактор тканевой; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-α; TNFAIP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFRSF10 (TRAIL); TNFRSF11 (TRANCE); TNFRSF12 (AP03L); TNFRSF13 (April); TNFRSF13B; TNFRSF14 (HVEM-L); TNFRSF15 (VEGI); TNFRSF18; TNFRSF4 (лиганд OX40); TNFRSF5 (лиганд CD40); TNFRSF6 (FasL); TNFRSF7 (лиганд CD27); TNFRSF8 (лиганд CD30); TNFRSF9 (лиганд 4-1BB); TOLLIP; Toll-подобных рецепторов; TOP2A (топоизомераза IIa); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; версикана; VHL C5; VLA-4; XCL1 (лимфотактин); XCL2 (SCM-1b); XCR1 (GPR5 / CCXCR1); YY1; и ZFPM2.

[0095] Учитывая способность связывающих белков к связыванию с двумя или более антигенами, связывающие белки по настоящему изобретению могут быть использованы для детекции антигенов (например, в биологическом образце, таком как сыворотка или плазма крови) с помощью стандартного иммуноанализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) или иммуногистохимия ткани. FIT-Ig прямо или опосредованно метят детектируемым веществом для облегчения детекции связанного или несвязанного антитела. Подходящие детектируемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, [3-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают

стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин-флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества включает люминол; и примеры подходящего радиоактивного

5 вещества включают ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho или ^{153}Sm .

[0096] Связывающие белки по настоящему изобретению в одном варианте реализации изобретения способны нейтрализовать активность антигенов как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, такие FIT-Ig могут быть использованы для ингибирования активности антигенов, например, в клеточной культуре, содержащей эти антигены, у субъектов-людей или у других субъектов-млекопитающих, имеющих антигены, с которыми перекрестно реагирует связывающий белок по настоящему изобретению. В другом варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ уменьшения активности антигена у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, обусловленным негативным воздействием этого антигена. Связывающий белок по

10 настоящему изобретению можно вводить субъекту-человеку для терапевтических целей.

[0097] Используемый в данном документе термин «нарушение, при котором активность антигена оказывает негативное влияние», включая заболевания и другие нарушения, при которых конкретного антигена у субъекта, страдающего от этого нарушения, является, как было показано, ответственным, или ожидается, что оно либо является ответственным за патофизиологию этого нарушения, либо является фактором, который способствует ухудшению этого нарушения. Соответственно, нарушение, при котором активность антигена является вредной, представляет собой нарушение, при котором, как ожидается, уменьшение активности антигена будет ослаблять симптомы и/или прогрессирование этого нарушения. Такие нарушения могут быть обнаружены, например, по увеличению концентрации антигена в биологической жидкости субъекта, страдающего от этого нарушения (например, по увеличению концентрации антигена в сыворотке, плазме, синовиальной жидкости, и т.д. субъекта). Неограничивающие примеры нарушений, которые можно лечить связывающими белками по настоящему изобретению, включают эти нарушения, рассмотренные ниже и в разделе, относящемся к фармацевтическим композициям антител по настоящему изобретению.

20 25 30

[0098] FIT-Ig по настоящему изобретению могут связывать один антиген или множество антигенов. Такие антигены включают, в том числе, мишени, перечисленные в следующих базах данных, которые включены в данный документ посредством ссылки. Эти целевые базы данных включают в том числе следующие перечни:

- 35 • Терапевтические мишени (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);
- Цитокины и рецепторы цитокинов (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokin.de/cope.cgi> и
- http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);
- 40 • Хемокины (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);
- Рецепторы хемокинов и GPCR (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);
- Обонятельные рецепторы (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);
- Рецепторы (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);
- 45 • Мишени, ассоциированные со злокачественными опухолями (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);
- Секретируемые белки как потенциальные мишени антител (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);

- Протеинкиназы (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>) и
- Маркеры CD человека (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) и (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6).

5 [0099] FIT-Ig применимы в качестве терапевтических средств для одновременной блокировки двух разных мишеней для усиления эффективности/безопасности и/или расширения охвата пациентов. Такие мишени могут включать растворимые мишени (ИЛ-13 и ФНО) и мишени-рецепторы клеточной поверхности (VEGFR и EGFR). Можно также использовать индукцию изменения направления цитотоксичности между

10 опухолевыми клетками и Т-клетками (Her2 и CD3) для раковой терапии или между аутореактивной клеткой и эффекторными клетками для аутоиммунитета/трансплантации, или между любой клеткой-мишенью и эффекторной клеткой для элиминации индуцирующих заболевание клеток при любом конкретном заболевании.

[00100] В дополнение к этому, FIT-Ig может быть использован для запуска

15 кластеризации и активации рецепторов, когда он сконструирован с возможностью направленного связывания двух различных эпитопов на одном и том же рецепторе. Это может быть выгодным при получении агонистических и антагонистических терапевтических средств, специфичных по отношению к GPCR. В этом случае FIT-Ig может быть использован для направленного связывания двух различных эпитопов па

20 одной клетке для кластеризации/передачи сигнала (две молекулы клеточной поверхности) или передачи сигнала (на одной молекуле). Аналогично, молекула FIT-Ig может быть сконструирована таким образом, чтобы инициировать связывание рецептора CTLA-4 и отрицательный сигнал путем направленного взаимодействия с двумя различными эпитопами (или 2 копиями одного и того же эпитопа) внеклеточного

25 домена CTLA-4, следствием чего является подавление иммунного ответа. CTLA-4 является клинически валидированной мишенью для терапевтического лечения ряда иммунологических нарушений. Взаимодействия CTLA-4/B7 негативно регулируют активацию Т-клеток аттенуацией прогрессирования клеточного цикла, продуцирования ИЛ-2 и пролиферации Т-клеток после активации, и участие CTLA-4 (CD 152) может

30 отрицательно регулировать активацию Т-клеток и стимулировать индукцию иммунологической толерантности. Однако стратегия аттенуации Т-клеток участием агонистического антитела с использованием CTLA-4 была безуспешной, так как активация CTLA-4 требует связывания. Молекулярное взаимодействие CTLA-4/B7 происходит в рядах «перекошенной молнии», как показано структурным анализом

35 кристаллов (Stamper 2001 Nature 410:608). Однако ни один из доступных в настоящее время агентов связывания CTLA-4 не обладает свойствами связывания, включая моноклональные антитела к CTLA-4. Предпринималось несколько попыток преодоления этой проблемы. В одном случае генерировали связанное с клеточной мембраной одноцепочечное антитело, которое значительно ингибировало аллогенное отторжение

40 у мышей (Hwang 2002 JI 169:633). В другом случае генерировали искусственное связанное с поверхностью APC одноцепочечное антитело к CTLA-4 и показали, что оно аттенуирует Т-клеточные реакции (Griffin 2000 JI 164:4433). В обоих случаях связывание CTLA-4 достигалось близко локализованными мембраносвязанными антителами в искусственных системах. Хотя эти эксперименты обеспечивают доказанную концепцию

45 иммунной понижающей регуляции путем запуска CTLA-4 негативной передачи сигнала, реагенты, используемые в указанных сообщениях, не подходят для терапевтического использования. Для данной цели связывание CTLA-4 может быть достигнуто путем использования молекулы FIT-Ig, которая нацелена на два разных эпитопа-мишени (или

2 копии одного и того же эпитопа) внеклеточного домена CTLA-4. Основанием для этого является то, что расстояние, разделяющее два сайта связывания IgG, приблизительно 150-170 Ангстрем, является слишком большим для активного связывания CTLA-4 (30-50 Å между 2 гомодимерами CTLA-4). Однако расстояние между двумя сайтами связывания на FIT-Ig (на одном плече) является гораздо более коротким, также в диапазоне 30-50 Å, что делает возможным правильное связывание CTLA-4.

[00101] Аналогично, FIT-Ig может быть нацелен на два различных члена комплекса рецепторов клеточной поверхности (например, ИЛ-12R альфа и бета). Кроме того, FIT-Ig может быть нацелен на CR1 и растворимый белок/патоген для запуска быстрого клиренса растворимого белка/патогена-мишени.

[00102] В дополнение к этому, FIT-Ig настоящего изобретения могут быть использованы для тканеспецифической доставки (направленное связывание с тканевым маркером и медиатором заболевания для усиления локальной фармакокинетики и, следовательно, обеспечения более высокой эффективности и/или более низкой токсичности), включая внутриклеточную доставку (направленное связывание с интернализирующимся рецептором и внутриклеточной молекулой), доставку во внутреннюю часть головного мозга (направленное связывание с рецептором трансферрина и медиатором заболевания ЦНС для пересечения гематоэнцефалического барьера). FIT-Ig может также служить в качестве белка-носителя для доставки антигена в специфическое местоположение посредством связывания с ненейтрализующим эпитопом данного антигена, а также для увеличения периода полувыведения антигена. Кроме того, FIT-Ig может быть сконструирован либо для физического связывания с медицинскими устройствами, имплантируемыми пациентам, либо для нацеливания этих медицинских устройств (Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B. Zotarolimus (ABT-578) eluting stents. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006), 58(3), 437-446; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. Hildebrand, H.F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschin, F. *Surface and Coatings Technology* (2006), 200 (22-23), 6318-6324; Drug/ device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. Wu, Peng; Grainger, David W. *Biomaterials* (2006), 27 (11), 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices. Marques, A.P.; Hunt, J.A.; Reis, Rui L. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2005), 377-397; Page: 52.

[00103] Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices. Marques, A.P.; Hunt, J.A.; Reis, Rui L. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2005), 377-397). Кратко, направление подходящих типов клетки к сайту медицинского имплантата может стимулировать заживление и восстановление нормальной функции ткани. В качестве альтернативы обеспечено также ингибирование медиаторов (включая, в том числе, цитокинов), высвобождаемых после имплантации устройства, посредством FIT-Ig, нанесенного на поверхность устройства или направленно связанного с поверхностью устройства. Например, в течение многих лет в инвазивной кардиологии использовали стенты для очистки заблокированных артерий и для улучшения тока крови к сердечной мышце. Однако известно, что традиционные стенты из оголенного металла вызывают рестеноз (повторное сужение артерии в обработанной зоне) у некоторых пациентов и могут приводить к тромбам. Недавно был описан покрытый антителом к CD34 стент, который уменьшал рестеноз и предотвращал появление тромбов путем захвата эндотелиальных клеток-предшественников (EPC), циркулирующих в крови. Эндотелиальные клетки являются

клетками, которые выстилают кровеносные сосуды, обеспечивая гладкое протекание крови. ЕРС прикрепляются к твердой поверхности стента, образуя гладкий слой, который не только стимулирует заживление, но и предотвращает рестеноз и тромбы, осложнения, ранее ассоциированные с применением стентов (Aoji et al., 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10):1574-9). Кроме улучшения исходов для пациентов, которым необходимы стенты, имеются также осложнения для пациентов, требующих операции для сердечно-сосудистого шунтирования. Например, протезный сосудистый канал (искусственная артерия), покрытая антителами к ЕРС, мог бы исключить необходимость применения артерий ног или рук пациента для трансплантатов обходного шунтирования. Это могло бы уменьшить время операции и анестезии, что, в свою очередь, будет уменьшать количество смертей при аортокоронарном шунтировании. FIT-Ig конструируют таким образом, что он связывается с маркером клеточной поверхности (таким как CD34), а также белком (или эпитопом любого рода, в том числе, но не только, с липидами и полисахаридами), который был нанесен на имплантированное устройство для облегчения рекрутинга клеток. Такие подходы могут быть также использованы для других медицинских имплантатов в общем. В качестве альтернативы FIT-Ig могут быть нанесены на медицинские устройства и после имплантации и высвобождения всех FIT из этого устройства (или при любой другой необходимости, которая может требовать дополнительного свежего FIT-Ig, включая старение и денатурацию уже нанесенного FIT-Ig) это устройство могло бы перезагружаться системным введением свежего FIT-Ig пациенту, причем этот FIT-Ig предназначается для связывания с представляющей интерес мишенью (цитокином, маркером клеточной поверхности (таким как CD34) и т.д.) с использованием одного набора сайтов связывания и с мишенью, нанесенной на это устройство (включая белки, эпитоп любого рода, в том числе, но не только, липиды, полисахариды и полимеры), с использованием другого набора сайтов связывания. Данный способ обладает преимуществом пролонгирования применимости покрытых имплантатов.

[00104] Молекулы FIT-Ig по настоящему изобретению применимы также в качестве терапевтических молекул для лечения различных заболеваний. Такие молекулы FIT-Ig могут связывать одну или более мишеней, участвующих в конкретном заболевании. Примеры таких мишеней в разных заболеваниях описаны ниже.

[00105] Многие белки участвуют в общих аутоиммунных и воспалительных реакциях, включая C5, CCL1 (I-309), CCL11 (эотаксин), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MTP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / эотаксин-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / 1P-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, ИЛ-17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (эндотелиальный моноцит-активирующий цитокин), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, TL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA-4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19,

CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, TFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, TL1R2, TL2, TL2RA, TL2RB, TL2RG, TL3, TL4, TL4R, TL5, IL5RA, TL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R1, TGFB1R2, TGFB1R3, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2 и RNF110 (ZNF144). Также представлены FIT-Ig, способные к связыванию одной или более мишеней, перечисленных выше.

[00106] Аллергическая астма характеризуется наличием эозинофилии, метаплазии бокаловидных (эпителиальных) клеток, изменений эпителиальных клеток, гиперреактивности дыхательных путей (АНР) и экспрессии цитокинов Th2 и Th1, а также повышенными уровнями сывороточного IgE. В настоящее время широко признается, что воспаление дыхательных путей является ключевым фактором, лежащим в основе патогенеза астмы, включающим в себя сложное взаимодействие воспалительных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, эозинофилы, тучные клетки и макрофаги, и их секретируемых медиаторов, включая цитокины и хемокины. В настоящее время кортикостероиды являются наиболее важными противовоспалительными средствами в лечении астмы, однако их механизм действия является неспецифическим и существуют проблемы безопасности, особенно в популяции юношеских пациентов. Таким образом, оправданной является разработка более специфических и нацеленных методов терапии. Имеется растущее доказательство того, что ИЛ-13 у мышей имитирует многие признаки астмы, включая АНР, гиперсекрецию слизи и фиброз дыхательных путей, независимо от эозинофильного воспаления (Finotto et al., *International Immunology* (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., *Journal of Immunology* (2005), 174(12), 8097-8105).

[00107] Предполагалось, что ИЛ-13 играет центральную роль в индукции патологических реакций, ассоциированных с астмой. Развитие терапии с использованием моноклональных антител к ИЛ-13 для уменьшения эффектов ИЛ-13 в легком является захватывающим новым подходом, который предоставляет важную перспективу в качестве нового лечения астмы. Однако другие медиаторы дифференциальных иммунологических путей также участвуют в патогенезе астмы, и блокирование этих медиаторов, наряду с ИЛ-13, могут принести дополнительную терапевтическую пользу. Такие пары мишеней включают в том числе ИЛ-13 и провоспалительный цитокин, такой как фактор-α некроза опухолей (TNF-α). TNF-α может усиливать воспалительную реакцию при астме и может быть связан с тяжестью заболевания (McDonnell, et al., *Progress in Respiratory Research* (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.). Это предполагает, что блокирование как ИЛ-13, так и TNF-α может иметь благоприятные действия, в частности, при тяжелом заболевании дыхательных путей. В предпочтительном варианте реализации изобретения FIT-Ig по настоящему изобретению связывается с мишенями ИЛ-13 и TNF-α и используется для лечения астмы.

[00108] Модели на животных, такие как модель ОВА-индуцированной астмы мыши, где могут оцениваться как воспаление, так и АНР, известны в данной области и могут быть использованы для определения способности различных молекул FIT-Ig в лечении

астмы. Модели на животных для изучения астмы описаны у Coffman, et al., *Journal of Experimental Medicine* (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., *Advances in Immunology* (2001), 77, 263-295; Boyce et al., *Journal of Experimental Medicine* (2005), 201(12), 1869-1873; и Snibson, et al., *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* (2005), 35 (2), 146-52. Кроме стандартных способов оценивания безопасности этих пар мишеней, специфические тесты на степень иммуносупрессии могут быть оправданными и полезными в отборе наилучших пар мишеней (смотри Luster et al., *Toxicology* (1994), 92 (1-3), 229-43; Descotes, et al., *Developments in biological standardization* (1992), 77 99-102; Hart et al., *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2001), 108(2), 250-257).

[00109] На основе описанного выше обоснования и с использованием той же самой модели оценивания на эффективность и безопасность могут быть определены другие пары мишеней, которые могут связывать молекулы FIT-Ig и быть применимы для лечения астмы. Предпочтительно такие мишени включают, в том числе, ИЛ-13 и ИЛ-1-бета, поскольку ИЛ-1-бета также участвует в воспалительной реакции при астме; ИЛ-13 и цитокины и хемокины, которые участвуют в воспалении, такие как ИЛ-13 и ИЛ-9; ИЛ-13 и ИЛ-4; ИЛ-13 и ИЛ-5; ИЛ-13 и ИЛ-25; ИЛ-13 и TARC; ИЛ-13 и MDC; ИЛ-13 и MIF; ИЛ-13 и TGF- β ; ИЛ-13 и агонист LHR; ИЛ-13 и CL25; ИЛ-13 и SPRR2a; ИЛ-13 и SPRR2b; и ИЛ-13 и ADAM8. Настоящее изобретение обеспечивает также FIT-Ig, способные связывать одну или более мишеней, участвующих в астме, выбранных из группы, состоящей из CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, гистамина и рецепторов гистамина, IE1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, ИЛ-17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR и хитиназы.

[00110] Ревматоидный артрит (РА), системное заболевание, характеризуется хронической воспалительной реакцией в синовии суставов и ассоциировано с дегенерацией хряща и эрозией околосуставной кости. В заболевших суставах экспрессируются многие провоспалительные цитокины, включая ФНО, хемокины и факторы роста. Было показано, что системное введение антитела к ФНО или слитого белка sTNFR в модели РА мыши является противовоспалительным и защищающим суставы. Клинические исследования, в которых активность ФНО у пациентов с РА блокировали введенным внутривенно инфликсимабом (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of Clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:I61-4), химерным моноклональным антителом к ФПО (мАТ), обеспечивали доказательство того, что ФНО регулирует продуцирование ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1 и VEGF, рекрутинг иммунных и воспалительных клеток в суставы, ангиогенез и уменьшение уровней в крови матриксных металлопротеиназ-1 и -3. Лучшее понимание воспалительного пути в ревматоидном артрите привело к идентификации других терапевтических мишеней, участвующих в ревматоидном артрите. Подающие надежду способы лечения, такие как способы с использованием антагонистов интерлейкина-6 (MRA), CTLA4Ig (абатацепта, Genovese Me et al., 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med*. 353:1114-23.), и анти-B-клеточной терапии (ритуксимаб, Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 351:1909) уже были испытаны в рандомизированных контролируемых испытаниях на протяжении прошлого года. Были идентифицированы

другие цитокины, и было показано, что они являются полезными в моделях животных, в том числе интерлейкин-15, интерлейкин-17 и интерлейкин-18, и клинические испытания этих агентов проводятся в настоящее время. Терапия с использованием антитела с двойной специфичностью, объединяющая антитело к ФНО и другой медиатор, имеет

5 большой потенциал в увеличении клинической эффективности и/или охвата пациентов. Например, блокирование как ФНО, так и VEGF может потенциально ликвидировать воспаление и ангиогенез, оба из которых участвуют в патофизиологии РА. Обсуждается также блокирование других пар мишеней, участвующих в РА, включающих, в том числе, ФНО и ИЛ-18; ФНО и ИЛ-12; ФНО и ИЛ-23; ФНО и ИЛ-1-бета; ФНО и MIF;

10 ФНО и ИЛ-17; и ФНО и ИЛ-15, специфическими FIT-Ig. Кроме рутинных способов оценивания безопасности этих пар мишеней, специфические тесты на степень иммуносупрессии могут быть оправданными и полезными в отборе наилучших пар мишеней (см. Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al, Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical

15 Immunology (2001), 108(2), 250-257). Будет ли молекула FIT-Ig применима для лечения ревматоидного артрита, может быть оценено с использованием доклинических моделей РА на животных, таких как мышинные модели индуцированного коллагеном артрита. Другие применимые модели также хорошо известны в данной области (см. Brand DD., Comp Med. (2005) 55(2): 114-22).

20 [00111] Отличительным признаком иммунопатогенеза SLE является активация поликлональных В-клеток, которая приводит к гиперглобулинемии, продуцированию аутоантител и образованию иммунных комплексов. Фундаментальной аномалией является, по-видимому, неспособность Т-клеток подавлять запретные клоны В-клеток вследствие генерализованной нарушенной регуляции Т-клеток. Кроме того,

25 взаимодействие В- и Т-клеток облегчается несколькими цитокинами, такими как ИЛ-10, а также костимулирующими молекулами, такими как CD40 и CD40L, B7 и CD28, и CTLA-4, которые инициируют второй сигнал. Эти взаимодействия вместе с нарушенным фагоцитарным клиренсом иммунных комплексов и апоптотического материала сохраняют навсегда эту иммунную реакцию с полученным тканевым повреждением.

30 Следующие мишени могут участвовать в SLE и могут быть потенциально использованы для подхода на основе FIT-Ig к терапевтическому вмешательству: методы анти-В-клеточной терапии: CD-20, CD-22, CD-L9, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA,

35 BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA и NT5E.; костимулирующие сигналы: CTLA4 или B7.1/B7.2; ингибирование выживания В-клеток: BlyS, BAFF;

40 инактивация комплемента: C5; модуляция цитокинов: ключевым принципом является то, что чистая биологическая реакция в любой ткани является результатом баланса между локальными уровнями провоспалительных или противовоспалительных цитокинов (см. Sfrikakis PP et al., 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7). Считается, что SLE является запускаемым Th-2 заболеванием с документально подтвержденным

45 увеличением уровней ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 в сыворотке крови. Обсуждаются также FTT-Ig, способные связывать одну или более мишеней, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, IFN- α и ФНО- α . Комбинация обсуждаемых выше мишеней будет увеличивать терапевтическую эффективность в отношении SLE, которая может быть

испытана в ряде доклинических моделей волчанки (см. Peng SL (2004) *Methods Mol Med.*; 102:227-72).

[00112] Множественный склероз (МС) является комплексным заболеванием аутоиммунного типа человека преимущественно неизвестной этиологии.

5 Иммунологическая деструкция миелинового основного белка (МВР) во всей нервной системе является основной патологией множественного склероза. МС является заболеванием комплексных патологий, которое включает в себя инфильтрацию CD4+ и CD8+ Т-клетками и реакцию в центральной нервной системе. Экспрессия в ЦНС цитокинов, реакционноспособные молекулы азота и костимулирующие молекулы - все
10 были описаны в МС. Наиболее важными являются иммунологические механизмы, которые способствуют развитию аутоиммунитета. В частности, экспрессия антигенов, взаимодействия цитокинов и лейкоцитов и регуляторные Т-клетки, которые способствуют балансу /модуляции других Т-клеток, таких как клетки Th1 и Th2, являются важными областями для идентификации терапевтических мишеней.

15 [00113] ИЛ-12 является провоспалительным цитокином, который продуцируется АПК и стимулирует дифференцировку Th1-эффекторных клеток. ИЛ-12 продуцируется при развивающихся повреждениях у пациентов с МС, а также у ЕАЕ-пораженных животных. Ранее было показано, что вмешательство в ИЛ-12-пути эффективно предотвращает ЕАЕ у грызунов и что нейтрализация *in vivo* ИЛ-12p40 с помощью мАт
20 к ИЛ-12 оказывает благоприятные действия в индуцированной миелином модели ЭАЭ у обыкновенных мартышек.

[00114] TWEAK является представителем ФНО-семейства, конститутивно экспрессируемым в центральной нервной системе (ЦНС), с провоспалительным, пролиферативным или апоптотическим действиями в зависимости от типов клеток. Его
25 рецептор, Fn14, экспрессируется в ЦНС эндотелиальными клетками, реактивными астроцитами и нейронами. Экспрессия мРНК TWEAK и Fn14 увеличивалась в спинном мозге во время экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ). Лечение антителом к TWEAK при ЭАЭ, индуцированном миелин-олигодендроцитным-гликопротеином (MOG), у мышей линии C57BL/6 приводило к уменьшению тяжести
30 заболевания и инфильтрации лейкоцитами при лечении мышей после фазы праймирования.

[00115] Один аспект данного изобретения относится к молекулам FIT-Ig, способным к связыванию одной или более, предпочтительно двух мишеней, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12, TWEAK, ИЛ-23, CXCL13, CD40, CD40L, ИЛ-18, VEGF, VLA-4,
35 ФНО, CD45RB, CD200, IFN-гамма, GM-CSF, FGF, C5, CD52 и CCR2. Предпочтительный вариант реализации изобретения включает биспецифический FIT-Ig, специфичный по отношению к ИЛ-12/TWEAK, в качестве терапевтического средства, оказывающего благоприятное воздействие при лечении МС. В данной области известны несколько моделей на животных для оценки применимости молекул FIT-Ig для лечения МС (см.
40 Steinman L, et al., (2005) *Trends Immunol.* 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) *Springer Semin Immunopathol.* 8(3): 197-208; Genain CP, et al., (1997) *J Mol Med.* 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) *J Exp Med.* 189(7): 1033-42; Owens T, et al., (1995) *Neurol Clin.* 13(1):51-73; and 't Hart BA, et al., (2005) *J Immunol* 175(7):4761-8. Кроме стандартных способов оценивания безопасности этих пар мишеней, специфические тесты на степень
45 иммуносупрессии могут быть оправданными и полезными в отборе наилучших пар мишеней (см. Luster et al., *Toxicology* (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., *Developments in biological standardization* (1992), 77 99-102; Jones R. 2000 *Rovelizumab* (ICOS Corp). *IDrugs.* 3(4):442-6).

[00116] Патологическая физиология сепсиса инициируется компонентами наружной мембраны как грамотрицательных организмов (липосахаридом [ЛПС], липидом А, эндотоксином), так и грамположительных организмов (липотейхоевой кислотой, пептидогликаном). Эти компоненты наружной мембраны способны связываться с CD14-рецептором на поверхности моноцитов. Затем, посредством недавно описанных toll-подобных рецепторов сигнал переносится в клетку, приводя к конечному продуцированию провоспалительных цитокинов фактора некроза опухолей альфа (ФНО-α) и интерлейкина-1 (ИЛ-1). Сокрушительные воспалительные и иммунные реакции являются важными признаками септического шока и играют центральную роль в патогенезе повреждения ткани, недостаточности множественных органов и смерти, индуцированных сепсисом. Было показано, что цитокины, в частности фактор некроза опухолей (ФНО) и интерлейкин (ИЛ-1), являются решающими медиаторами септического шока. Эти цитокины оказывают прямое токсическое действие на ткани; они также активируют фосфолипазу А2. Эти и другие действия приводят к увеличенным концентрациям активирующего тромбоциты фактора, стимуляции активности синтазы оксида азота, стимуляции инфильтрации тканей нейтрофилами и стимуляции активности нейтрофилов.

[00117] Лечение сепсиса и септического шока остается клинической загадкой, и недавние перспективные испытания с модификаторами биологических реакций (т.е. антитела к ФНО, антитела к MIF), нацеленными на воспалительную реакцию, показали только умеренную клиническую пользу. Недавно интерес переместился в направлении способов терапии, нацеленных на обращение сопутствующих периодов иммунной супрессии. Исследования на экспериментальных животных и критически больных пациентах показали, что увеличенный апоптоз лимфоидных органов и некоторых паренхимных тканей способствует иммунной супрессии, анергии и дисфункции системы органов. Во время синдромов сепсиса апоптоз лимфоцитов мог запускаться отсутствием ИЛ-2 или высвобождением глюкокортикоидов, гранзимов или так называемых цитокинов «смерти»: фактора альфа некроза опухолей или Fas-лиганда. Апоптоз протекает через аутоактивацию цитозольных и митохондриальных каспаз, на которые влияют про- и антиапоптотические члены Bcl-2-семейства. У экспериментальных животных лечение ингибиторами апоптоза может не только предотвращать апоптоз лимфоидных клеток; оно может также улучшать исход заболевания. Хотя клинические испытания с использованием антиапоптотических средств остаются отдаленными, по большей части, вследствие технических трудностей, связанных с их введением и нацеливанием на ткани, ингибирование апоптоза лимфоцитов представляет привлекательную терапевтическую мишень для септического пациента. Подобным образом, обладающее двойной специфичностью средство, направленно связывающее как воспалительный медиатор, так и апоптотический медиатор, может иметь дополнительное преимущество. Один аспект данного изобретения относится к FIT-Ig, способным связывать одну или более мишеней, участвующих в патогенезе сепсиса, предпочтительно две мишени, выбранные из группы, состоящей из ФНО, ИЛ-1, MIF, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-12, ИЛ-23, FasL, LPS, Toll-подобных рецепторов, TLR-4, тканевого фактора, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL10, IL1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, ИЛ-10, ИЛ-1 B, ИЛ-6, ADORA2A, CCR3, ИЛ-10, ИЛ-1B, ИЛ-1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, мидкин, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SFRPTNFI и TREM1. Эффективность таких FIT-Ig в отношении сепсиса можно оценить на доклинических моделях животных, известных в данной области (см. Buras JA, et al., (2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 и Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2): 164-70).

[00118] Хронические нейродегенеративные заболевания обычно связанными со

старением заболеваниями, характеризующимися прогрессирующей потерей нейронных функций (смертью нервных клеток, демиелинизацией), потерей подвижности и потерей памяти. Появляющееся знание механизмов, лежащих в основе хронических нейродегенеративных заболеваний (например, болезни Альцгеймера) показывает комплексную этиологию, и было признано, что различные факторы способствуют их развитию и прогрессированию, например, старение, гликемический статус, продуцирование и мультимеризация амилоида, накопление прогрессирующих конечных продуктов гликозилирования (AGE), которые связываются с их рецептором (RAGE) (рецептором AGE), увеличенный окислительный стресс головного мозга, уменьшенный церебральный кровоток, нейровоспаление, включая высвобождение воспалительных цитокинов и хемокинов, дисфункцию нейронов и активацию микроглии. Таким образом, эти хронические нейродегенеративные заболевания представляют комплексное взаимодействие между множественными типами клеток и медиаторами. Стратегии лечения для таких заболеваний ограничены и в основном составляют либо блокирование воспалительных процессов неспецифическими противовоспалительными агентами (например, кортикостероидами, ингибиторами COX) или агентами для предотвращения потери нейронов и/или синаптических функций. Эти способы лечения не могут остановить прогрессирование заболевания. Недавние исследования предполагают, что более направленно воздействующие терапевтические средства, такие как антитела к растворимому A- β -пептиду (включая олигомерные формы A-b) могут не только останавливать прогрессирование заболевания, но и могут также поддерживать память. Эти предварительные наблюдения предполагают, что специфические терапевтические воздействия, направленные более чем один медиатор (например, A- β и провоспалительный цитокин, такой как ФНО), могут обеспечивать даже лучшую терапевтическую эффективность в отношении хронических дегенеративных заболеваний, чем эффективность, наблюдаемая в случае направленного воздействия на один механизм развития заболевания (например, только растворимый A- β отдельно) (см. C.E. Shepherd, et al., *Neurobiol Aging*. 2005 Oct 24; Nelson RB., *Curr Pharm Des*. 2005; 11:3335; William L. Klein.; *Neurochem Int*. 2002; 41:345; Michelle C Janelins, et al., *J Neuroinflammation*. 2005; 2:23; Soloman B., *Curr Alzheimer Res*. 2004; 1:149; Igor Klyubin, et al., *Nat Med*. 2005; 11:556-61; Arancio O, et al., *EMBO Journal* (2004) 1-10; Bornemann KD, et al., *Am J Pathol*. 2001; 158: 63; Deane R, et al., *Nat Med*. 2003; 9:907-13; и Eliezer Masliah, et al., *Neuron*. 2005; 46:857).

[00119] Молекулы FIT-Ig по настоящему изобретению могут связывать одну или более мишеней, участвующих в патогенезе хронических нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Такие мишени включают, в том числе, любой медиатор, растворимый или находящийся на клеточной поверхности, участвующий в патогенезе AD, например, AGE (S100 A, амфотерин), провоспалительные цитокины (например, ИЛ-1), хемокины (например, MCP 1), молекулы, которые ингибируют регенерацию нерва (например, Nogo, RGM A), молекулы, которые усиливают рост нейритов (нейротрофины). Эффективность молекул FIT-Ig может быть валидирована в доклинических моделях на животных, таких как трансгенные мыши, которые характеризуются чрезмерной экспрессией белка-предшественника амилоида или RAGE и развитием симптомов болезни, подобной болезни Альцгеймера. В дополнение к этому, молекулы FIT-Ig могут быть сконструированы и исследованы в отношении эффективности в моделях на животных, и наилучшие терапевтические FIT-Ig могут быть отобраны для исследования на пациентах. Молекулы FIT-Ig могут быть также использованы для лечения других нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона. Альфа-синуклеин участвует в патологии болезни Паркинсона.

FIT-Ig, способные направленно связываться с альфа-синуклеином и воспалительными медиаторами, такими как ФНО, ИЛ-1, MCP-1, могут оказаться эффективной терапией для болезни Паркинсона и также рассматриваются в данном изобретении.

[00120] Несмотря на увеличение знания патологических механизмов, повреждение спинного мозга (SCI) все еще является разрушительным состоянием и представляет собой медицинское показание, характеризуемое высокой потребностью в лекарственных препаратах. Большинство повреждений спинного мозга являются контузионными или компрессионными повреждениями, и за первичным повреждением обычно следуют вторичные механизмы повреждения (воспалительные медиаторы, например, цитокины и хемокины), которые ухудшают начальное повреждение и приводят к значительному увеличению площади повреждения, иногда более чем в 10 раз. Эти первичные и вторичные механизмы в SCI очень сходны с механизмами в повреждении головного мозга, вызванном иным образом, например, инсультом. Не существует удовлетворительное лечение, и болюсная инъекция высокой дозы метилпреднизолона (MP) является единственной используемой терапией в узком окне времени 8 ч после повреждения. Однако эта обработка предназначена только для предотвращения вторичного повреждения, не вызывая любое значимое функциональное восстановление. Она в сильной степени критикуется за отсутствие недвусмысленной эффективности и тяжелые вредные побочные действия, такие как иммуносупрессия с последующими инфекциями и тяжелыми гистопатологическими мышечными изменениями. Не существуют одобренные другие лекарственные средства, биологические агенты или малые молекулы, стимулирующие эндогенный регенерационный потенциал, но в недавние годы перспективные принципы лечения и лекарства-кандидаты обнаруживали эффективность на животных моделях SCI. В большой степени отсутствие функционального восстановления в SCI человека обусловлено факторами, ингибирующими рост нейритов в участках повреждения, в ткани рубцов, в миелине, а также ассоциированных с повреждением клетках. Такими факторами являются миелин-ассоциированные белки NogoA, OMgp и MAG, RGM A, связанные с рубцами CSPG (хондроитинсульфатпротеогликаны) и ингибирующие факторы на реактивных астроцитах (некоторые семафорины и эфрины). Однако в участке повреждения обнаружены не только ингибирующие рост молекулы, но также стимулирующие рост нейритов факторы, такие как нейротрофины, ламинин, LI и другие. Этот ансамбль ингибирующих рост нейритов и стимулирующих рост молекул может объяснить то, что блокирующие единственные факторы, такие как NogoA или RGM A, приводили к значимому функциональному восстановлению на моделях SCI грызунов, поскольку уменьшение ингибирующих действий могло смещать баланс с ингибирования роста к стимуляции роста. Однако наблюдаемые восстановления с блокированием молекулы, ингибирующей вырост единственного нейрита, были неполными. Для достижения более быстрых и более ярко выраженных проявлений восстановления может быть желательным либо блокирование двух молекул, ингибирующих вырост нейрита, например, Nogo и RGM A, либо блокирование молекулы, ингибирующей вырост нейрита и усиливающей функции увеличивающей вырост нейрита молекулы, например, Nogo и нейротрофинов, либо блокированием молекулы, ингибирующей вырост нейрита, например, Nogo и провоспалительной молекулы, например, ФНО (см. McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003; 26:193; Marco Domeniconi, et al., J Neurol Sci. 2005; 233:43; Milan Makwanal, et al., FEBS J. 2005; 272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002; 298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005; 79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al., J. Neurochem. 2004; 91; 1018).

[00121] Предусмотрены другие FIT-Ig, способные к связыванию пар мишеней, такие как NgR и RGM A; NogoA и RGM A; MAG и RGM A; OMGr и RGM A; RGM A и RGM B; CSPG и RGM A; аггрекан, мидкин, нейрокан, версикан, фосфокан, Те38 и ФНО-а; Аβ глобуломер-специфические антитела, комбинированные с антителами, стимулирующими спрутинг дендритов и аксонов. Патология дендритов является очень ранним признаком AD, и известно, что NOGO A ограничивает рост дендритов. Можно комбинировать такой тип Ab с любым из SCI-кандидатных (миелиновые белки) Ab. Другие мишени FIT-Ig могут включать в себя любую комбинацию NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG или Omgr. В дополнение к этому, мишени могут включать в себя также любой медиатор, растворимый или находящийся на клеточной поверхности, участвующий в ингибировании нейрита, например, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, семафорины, эфрины, растворимый A-b, провоспалительные цитокины (например, ИЛ-1), хемокины (например, MIP 1a), молекулы, которые ингибируют регенерацию нейронов. Эффективность молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к nogo/RGM A или подобных молекул FIT-Ig может быть валидирована на доклинических моделях повреждения спинного мозга животных. В дополнение к этому, эти молекулы FIT-Ig могут быть сконструированы и исследованы в отношении эффективности на моделях животных, и наилучшие терапевтические FIT-Ig могут быть отобраны для тестирования на пациентах. В дополнение к этому, могут быть сконструированы молекулы FIT-Ig, которые нацелены на два разных сайта связывания лиганда на единственном рецепторе, например, рецепторе Nogo, который связывает три лиганда Nogo, Ompg и MAG, и RAGE, который связывает A-b и S100 A. Более того, ингибиторы выроста нейритов, например, nogo и рецептор nogo, также играют роль в предотвращении регенерации нервов при иммунологических заболеваниях, таких как множественный склероз. Было показано, что взаимодействие nogo-рецептор nogo усиливает восстановление на моделях множественного склероза животных. Таким образом, молекулы FIT-Ig молекулы, которые могут блокировать функцию одного иммунного медиатора, например, цитокина, такого как ИЛ-12, и молекулы ингибирования выроста нейрита, например, nogo или RGM, могут обеспечивать более быструю и более высокую эффективность, чем блокирование только либо иммунной молекулы, либо молекулы ингибитора выроста нейрита.

[00122] Терапия моноклональными антителами появилась как важный способ терапии рака (von Mehren M, et al., 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med.; 54: 343-69). Антитела могут проявлять противоопухолевое действие индуцированием апоптоза, изменением направленности цитотоксичности, вмешательством во взаимодействия лиганд-рецептор или предотвращением экспрессии белков, которые являются критическими в отношении неопластического фенотипа. В дополнение к этому, антитела могут быть нацелены на компоненты-мишени опухолевого окружения для искажения жизненных структур, например, образования опухоли-ассоциированной сосудистой сети. Антитела могут быть также нацелены на рецепторы-мишени, лигандами которых являются факторы роста, такие как рецептор эпидермального фактора роста. Таким образом, это антитело ингибирует природные лиганды, которые стимулируют рост клеток, препятствуя их связыванию с опухолевыми клетками-мишенями. В качестве альтернативы антитела могут индуцировать антиидиотипическую сеть, комплемент-опосредованную цитотоксичность или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Применение биспецифического антитела, которое нацелено на два отдельных опухолевых медиатора, будет, по-видимому, создавать дополнительное преимущество по сравнению с моноспецифической терапией. Рассматриваются также FIT-Ig, способные

к связыванию следующих пар мишеней, для лечения онкологического заболевания: IGF1 и IGF2; TGF1/2 и Erb2B; VEGFR и EGFR; CD20 и CD3, CD138 и CD20, CD38 и CD20, CD38 и CD138, CD40 и CD20, CD138 и CD40, CD38 и CD40. Другие комбинации мишеней включают один или более представителей семейства EGF/erb-2/erb-3. Другие мишени (одна или более), вовлеченные в развитие онкологических заболеваний, с которыми могут связываться FIT-Ig, включают, в том числе, мишени, выбранные из группы, состоящей из: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, 1NHA, ФНО, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, EGF, FGF 10, FGF 18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1, IGF 1R, TL2, VEGF, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, TLI A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLC, TGFB1T1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESRL ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1T2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPEN A3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROB02, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT 1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2TP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, TL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, F1GF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCLI1, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (Е-кадгерин), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-катенин), CTSB (катенсин В), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (гельсолин), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (гликопротеин 130), ITGA6 (a6-интегрин), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, CTLA-4, OX40, GITR, TIM-3, Lag-3, B7-H3, B7-H4, GDF8, CGRP, Lingo-1, ICOS, GARP, BTLA, CD160, ROR1, SERPINB5 (маслин), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1 (тромбоспондин-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (топоизомераза Iia), TP53, AZGP1 (цинк-а-гликопротеин), BPAG1 (плектин), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (клаудин-7), CLU (кластерин), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (фибронектин), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (интегрин a6), ITGB4 (интегрин b 4), KLF5 (GC-

блок BP), KRT19 (кератин 19), KRT16 (кератин, специфического для волос типа 11), MACMARCKS, MT3 (металлотрионектин-III), MUC1 (муцин), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (липофилин B), SCGB2A1 (маммаглобин 2), SCGB2A2 (маммаглобин 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4 и TNFAIP2 (B94).

5 [00123] В одном варианте реализации изобретения заболевания, которые можно лечить или диагностировать с использованием композиций и способов, предложенных в данном документе, включают, в том числе, первичные и метастатические злокачественные опухоли, включая карциномы молочной железы, толстой кишки, прямой кишки, легкого, ротовой части глотки, гортанной части глотки, пищевода, 10 желудка, поджелудочной железы, печени, желчного пузыря и желчных протоков, тонкого кишечника, мочевыводящих путей (включая почки, мочевой пузырь и уретерии), женских половых путей (включая шейку матки, матку и яичники, а также хориокарциному и гестационную трофобластическую болезнь), мужских половых путей (включая предстательную железу, семенные пузырьки, яички и эмбрионально-клеточные 15 опухоли), эндокринных желез (включая щитовидную железу, надпочечники и гипофиз) и кожи, а также гемангиомы, меланомы, саркомы (включая те, что возникают из костных и мягких тканей, а также саркому Капоши), опухоли головного мозга, нервной ткани и оболочек головного мозга (включая астроцитомы, глиомы, глиобластомы, ретинобластомы, невромы, нейробластомы, шванномы и менингиомы), солидные 20 опухоли, возникающие из гемопоэтических злокачественных заболеваний, таких как лейкозы и лимфомы (как лимфомы Ходжкина, так и неходжкинские лимфомы).

[00124] В одном варианте реализации изобретения антитела, предложенные в данном документе, или их антигенсвязывающие участки, используют для лечения рака или в предотвращении метастазов из опухолей, описанных в данном документе, либо при 25 использовании отдельно, либо в комбинации с радиотерапией и/или другими химиотерапевтическими средствами.

[00125] В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения эффекторная клетка иммунной системы человека является представителем лимфоидной клеточной линии человека. В этом варианте реализации изобретения эффекторная 30 клетка предпочтительно может представлять собой Т-клетку человека, В-клетку человека или натуральный киллер (NK) человека. Предпочтительно, чтобы такая клетка оказывала либо цитотоксическое, либо апоптотическое действие на клетку-мишень. Особенно предпочтительно, чтобы лимфоидная клетка человека представляла собой цитотоксическую Т-клетку, которая при активации оказывала бы цитотоксическое 35 действие на клетку-мишень. В соответствии с этим вариантом реализации изобретения, таким образом, направляемая активность эффекторной клетки человека - это цитотоксическая активность этой клетки.

[00126] В соответствии с предпочтительным вариантом реализации изобретения активация цитотоксических Т-клеток может происходить вследствие связывания антигена 40 CD3 как эффекторного антигена на поверхности цитотоксических Т-клеток биспецифическим антителом этого варианта реализации настоящего изобретения. Антиген CD3 человека присутствует как на хелперных Т-клетках, так и цитотоксических Т-клетках. CD3 человека обозначает антиген, который экспрессирован на Т-клетках в составе мультимолекулярного Т-клеточного комплекса и который содержит три разные 45 цепи: CD3-эпсилон, CD3-дельта и CD3-гамма.

[00127] Активация цитотоксического потенциала Т-клеток представляет собой сложное явление, которое требует взаимодействия множества белков. Белок Т-клеточный рецептор («TCR») представляет собой мембраносвязанный связанный

дисульфидной связью гетеродимер, состоящий из двух разных гликопротеиновых субъединиц. TCR распознает и связывает чужеродный пептидный антиген, который сам по себе был связан представителем очень разнообразного класса белков главного комплекса гистосовместимости («МНС») и презентируван, связан с МНС, на поверхности антиген-презентирующих клеток («АПК»).

[00128] Хотя вариабельный TCR связывает чужеродный антиген, как было обозначено выше, передача сигнала Т-клеткам, свидетельствующего о том, что это связывание произошло, зависит от присутствия других, невариабельных, сигнальных белков, ассоциированных с TCR. Эти сигнальные белки в ассоциированной форме вместе называются комплексом CD3, что в данном документе вместе называются антигеном CD3.

[00129] Активация Т-клеточной цитотоксичности, таким образом, обычно в первую очередь зависит от связывания TCR с белком МНС, который сам по себе связан с чужеродным антигеном, локализованным на отдельной клетке. Только когда происходит это первоначальное связывание TCR-МНС может реализоваться CD3-зависимый сигнальный каскад, отвечающий за клональную экспансию Т-клеток и, в конечном итоге, Т-клеточная цитотоксичность.

[00130] Однако связывание антигена CD3 человека первым или вторым участком биспецифического антитела по настоящему изобретению активирует Т-клетки для оказания цитотоксического эффекта на другие клетки в отсутствие независимого связывания TCR-МНС. Это означает, что в Т-клетках могут быть цитотоксически активированы клонально независимым образом, т.е. таким способом, который не зависит от специфического клона TCR, который несет Т-клетка. Это обеспечивает активацию целого Т-клеточного компартмента, а не только специфических Т-клеток определенной клональной принадлежности.

[00131] В свете вышеизложенного обсуждения, таким образом, в особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, при этом эффекторный антиген представляет собой антиген CD3 человека. Биспецифическое антитело в соответствии с этим вариантом реализации настоящего изобретения может содержать, в целом, либо два, либо три вариабельных домена антитела.

[00132] В соответствии с дополнительными вариантами реализации настоящего изобретения другие эффекторные антигены, ассоциированные с лимфоидными клетками, которые связывает биспецифическое антитело по настоящему изобретению, могут представлять собой антиген CD16 человека, антиген NKG2D человека, антиген NKp46 человека, антиген CD2 человека, антиген CD28 человека или антиген CD25 человека.

[00133] В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения эффекторная клетка иммунной системы человека является представителем миелоидной клеточной линии человека. Предпочтительно эффекторная клетка может представлять собой моноцит человека, нейтрофильный гранулоцит человека или дендритную клетку человека. Предпочтительно, чтобы такая клетка оказывала либо цитотоксическое, либо апоптотическое действие на клетку-мишень. Предпочтительные антигены в рамках этого варианта реализации, которые может связывать биспецифическое антитело по настоящему изобретению, могут представлять собой антиген CD64 человека или антиген CD89 человека.

[00134] В соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения антиген-мишень представляет собой антиген, который уникальным образом экспрессирован на клетке-мишени или эффекторной клетке при патологическом

состоянии, но который либо не экспрессируется, экспрессируется на низком уровне, либо недоступен при нормальном состоянии здоровья. Примеры таких антигенов-мишеней, которые может специфически связывать биспецифическое антитело но
 5 настоящему изобретению, предпочтительно могут быть выбраны из EpCAM, CCR5, CD19, HER-2 neu, HER-3, HER-4, EGFR, PSMA, CEA, MUC-1 (муцин), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, β hCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD30, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, полисиаловой кислоты (ПСА), GD2, карбоангидразы IX (MN/CA IX), CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, плазмочитарного антигена, (мембраносвязанного) IgE, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы
 10 (MCSP), CCR8, предшественника ФНО-альфа, STEAP, мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), Ly-6; десмоглеина 4, нео-эпитопа E-кардерины, рецептора фетального ацетилхолина, CD25, маркера CA19-9, маркера CA-125 и рецептора типа II мюллеровой ингибирующей субстанции (МНС), sTn (сталированный Tn-антиген; TAG-72), FAP (антигена активации фибробластов),
 15 эндосиалина, EGFRvIII, LG, SAS и CD63.

[00135] В соответствии с конкретным вариантом реализации изобретения антиген-мишень, который специфически связывает биспецифическое антитело, может представлять собой опухолеспецифический антиген, то есть антиген, связанный со
 20 злокачественными новообразованиями. Такой антиген либо экспрессирован, либо экспонирован на клетке злокачественного новообразования, тогда как указанный антиген либо не содержится, содержится в незначительном количестве, либо не экспонирован на нормальной клетке. Соответственно, биспецифическое антитело в соответствии с этим вариантом реализации настоящего изобретения представляет собой биспецифическое антитело, которое направляет активность эффекторных клеток
 25 иммунной системы против злокачественных клеток-мишеней, несущих антиген-мишень или обеспечивающих к нему доступ.

[00136] Генная терапия: в конкретном варианте реализации последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающий белок, предложенный в данном документе, или другое профилактическое или терапевтическое средство, предложенное
 30 в данном документе, применяют для лечения, предотвращения, ведения или облегчения течения нарушения или одного, или более симптомов, ассоциированных с ними, путем генной терапии. Генная терапия относится к терапии, проводимой путем введения пациенту экспрессированной или экспрессируемой нуклеиновой кислоты. В этом варианте реализации нуклеиновые кислоты продуцируют кодируемое ими антитело
 35 или профилактическое, или терапевтическое средство, предложенное в данном документе, которое опосредует профилактический или терапевтический эффект.

[00137] Любой из способов генной терапии, доступных в данной области, может быть использован в соответствии с данным изобретением. В отношении общего обзора способов генной терапии см. Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu
 40 (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; Morgan and Anderson (1993) Ann Rev. Biochem. 62:191-217; и May (1993) TIBTECH 11(5): 155-215. Способы, широко известные в области технологии рекомбинантных ДНК, которые могут быть использованы, описаны у Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); и Kriegler, Gene
 45 Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Подробное описание различных способов генной терапии приведено в публикации патента США №. US 20050042664.

[00138] Диагностика: в настоящем описании также предложены применения в

диагностических целях включая, в том числе, методы диагностического анализа, диагностические наборы, содержащие один или более связывающих белков, и адаптацию способов и наборов для применения в автоматических и/или полуавтоматических системах. Предложенные способы, наборы и адаптации могут быть использованы при
 5 выявлении, мониторинге и/или лечении заболевания или нарушения у индивидуума. Это дополнительно освещается ниже.

[00139] А. Способ анализа: в настоящем описании также предложен способ определения наличия, количества или концентрации аналита или его фрагмента в исследуемом образце с использованием по меньшей мере одного связывающего белка, который описан в данном документе. Любой подходящий анализ, который известен в
 10 данной области техники, может быть использован в данном способе. Примеры включают, в том числе, иммуноанализы и/или способы, подразумевающие использование масс-спектрометрии. Иммуноанализы, предложенные в настоящем описании, могут включать, в том числе, иммуноанализы сэндвич-типа, радиоиммуноанализ (РИА), ферментный иммуноанализ (ФИА), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА),
 15 иммуноанализы на основе конкурентного ингибирования, флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА), метод иммуноанализа с ферментативным усилением (ЕМИТ), метод резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET) и гомогенный хемилюминесцентный анализ. Примером иммуноанализа может послужить
 20 хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах, в частности, подразумевающий применение автоматического анализатора ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.). Способы, подразумевающие применение масс-спектрометрии, предложены в настоящем описании, и включают, в том числе, MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация), или SELDI (усиленная поверхностью лазерная десорбция/
 25 ионизация).

[00140] Способы сбора, манипуляции, обработки и анализа биологических исследуемых образцов с использованием иммуноанализов и масс-спектрометрии, хорошо известные специалистам в данной области техники, предусмотрены для практического воплощения настоящего изобретения (US 2009-0311253 A1).

[00141] В. Набор: также предложен набор для анализа исследуемого образца на наличие, количество или концентрацию аналита или его фрагмента в исследуемом образце. Набор содержит по меньшей мере один компонент для анализа исследуемого образца на наличие аналита или его фрагмента и инструкции для анализа исследуемого образца на наличие аналита или его фрагмента. По меньшей мере один компонент для
 35 анализа исследуемого образца на наличие аналита или его фрагмента может включать композицию, содержащую связывающий белок, который описан в данном документе, и/или связывающий белок, специфичный по отношению к аналиту (или его фрагменту, варианту или фрагменту варианта), который необязательно иммобилизован на твердой фазе. Набор необязательно может содержать калибратор или контроль, который может
 40 содержать выделенный или очищенный аналит. Набор может содержать по меньшей мере один компонент для анализа исследуемого образца на наличие аналита путем иммуноанализа и/или масс-спектрометрии. Компоненты набора, включающие аналит, связывающий белок, и/или связывающий белок, специфичный по отношению к аналиту, или его фрагмент, необязательно могут быть мечеными с использованием любой
 45 известной в данной области техники детектируемой меткой. Материалы способы создания, предусмотренные для практического воплощения настоящего изобретения, известны специалистам в данной области техники (US 2009-0311253 A1).

[00142] С. Адаптация набора и способа: набор (или его компоненты), а также способ

определения наличия, количества или концентрации аналита в исследуемом образце с помощью анализа, такого как иммуноанализ, который описан в данном документе, могут быть адаптированы для применения в целом ряде автоматических и полув автоматических систем (включая те, в которых твердая фаза содержит микрочастицы), которые описаны, например, в патентах США №5089424 и 5006309 и которые коммерчески доступны на рынке, например, Abbott Laboratories (Abbott Park, Ill.), в качестве ARCHITECT®. Другие платформы, доступные от Abbott Laboratories, включают, в том числе, AxSYM®, IMx® (см., например, патент США №5294404, PRISM®, EIA (bead) и Quantum™ II, а также другие платформы. В дополнение к этому, анализы, наборы и компоненты набора могут быть использованы в других форматах, например, на потенциометрических или других переносных, или портативных аналитических системах. Настоящее изобретение, например, применимо к коммерческой портативной системе Abbott (i-STAT®, Abbott Laboratories) для потенциометрического иммуноанализа, которая осуществляет иммуноанализы сэндвич-типа. Иммуносенсоры и способы их изготовления и эксплуатации в испытательных устройствах одноразового применения описаны, например, в патентах США №.5063081, 7419821 и 7682833; и публикациях патентов США №.20040018577, 20060160164 и 20090311253. Специалистам в данной области техники без труда станет понятно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в данном документе, являются очевидными и могут быть применены с использованием подходящих эквивалентов, не отклоняясь от объема вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Из подробного описания определенных вариантов реализации изобретения они будут в большей степени понятны посредством ссылки на следующие примеры, которые включены только с иллюстративной целью и не носят ограничительного характера.

[00143] Хотя вышеизложенное изобретение было довольно подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях обеспечения ясности понимания, специалисту в данной области техники без труда будет понятно в свете идей настоящего изобретения, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в настоящее изобретение без отступления от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только с иллюстративной целью и не носят ограничительного характера. Специалистам в данной области техники без труда будут понятны целый ряд не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы, с получением, по сути, подобных результатов.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование, экспрессия, очистка и анализ иммуноглобулина с tandemным расположением Fab-фрагментов, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20 (FIT-Ig)

[00144] Чтобы продемонстрировать технологию FIT-Ig, была создана группа молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20: FIT1-Ig, FIT2-Ig и FIT3-Ig, все из которых содержат 3 разных полипептида, как показано на Фигуре 1, где антиген А представляет собой ИЛ-17, а антиген В представляет собой ИЛ-20. ДНК-конструкция, использованная для создания FIT-Ig, способного к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20, проиллюстрирована на Фигуре 1 В. Вкратце, родительские МАТ включали два высокоаффинных антитела, антитело к ИЛ-17 (клон LY) (патент США №7838638) и антитело к hIL-20 (клон 15D2) (публикация заявки на патент США №US2014/0194599). Для создания конструкции FIT-Ig №1, VL-CL клон LY непосредственно (FIT1-Ig) или через линкер, состоящий из 3 аминокислот (FIT2-Ig) или 7 аминокислот (FIT3-Ig), был слит с N-концом тяжелой цепи 15D2 (как показано в Таблице 1). Конструкция №2

представляет собой VH-CH1 клона LY, а третья конструкция представляет собой VL-CL клона 15D2. Три конструкции для каждого FIT-Ig были котрансфицированы в клетки 293, что приводило к экспрессии и секреции белка FIT-Ig.

[00145] Также была создана группа молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20: FIT4-Ig, FIT5-Ig и FIT6-Ig, каждая из которых содержит 2 разных полипептида, как показано на Фигуре 2. ДНК-конструкции, использованные для создания FIT-Ig, способного к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20, проиллюстрированы на Фигуре 2 В, где антиген А представляет собой ИЛ-17, а антиген В представляет собой ИЛ-20. Вкратце, родительские мАт включали два высокоаффинных антитела, антитело к ИЛ-17 (клон LY) и антитело к hIL-20 (клон 15D2). Для создания конструкции FIT-Ig №1, VL-CL клона LY непосредственно (FIT4-Ig) или через линкер, состоящий из 3 аминокислот (FIT5-Tg) или 7 аминокислот (FIT6-Ig), был слит с N-концом тяжелой цепи 15D2 (как показано в Таблице 1). Для создания конструкции FIT-Ig №4, VH-CH1 клона LY непосредственно (FIT4-Ig) или через линкер, состоящий из 3 аминокислот (FIT5-Ig) или 7 аминокислот (FIT6-Ig), был слит с N-концом легкой цепи 15D2. 2 ДНК-конструкции (конструкция №1 и №4) для каждого FIT-Ig были котрансфицированы в клетки 293, что приводило к экспрессии и секреции белка FIT-Ig. Методики ПЦР-клонирования подробно описаны ниже

Пример 1.1: молекулярное клонирование FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20:

[00146] Для клонирования конструкции №1 легкую цепь LY амплифицировали путем ПЦР с использованием прямых праймеров, гибридизующихся с сигнальной последовательностью легкой цепи, и обратных праймеров, гибридизующихся с С-концом легкой цепи. Тяжелую цепь 15D2 амплифицировали путем ПЦР с использованием прямых праймеров, гибридизующихся с N-концом 15D2 VH, и обратных праймеров, гибридизующихся с С-концом CH. Эти 2 ПЦР-фрагмента разделяли на агарозном геле и объединяли с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами с использованием пары праймеров для сигнального пептида и CH. Объединенный ПЦР-продукт клонировали в вектор для экспрессии в клетках 293, который изначально содержал последовательность Fc-области человека.

Таблица 1. Молекулы FIT-Ig, специфичные по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20 и ДНК-конструкции.

Молекула FIT-Ig	Конструкция №1	Линкер	Конструкция №2	Конструкция №3	Конструкция №4
FIT1-Ig	VL ₁₇ -CL- VH ₂₀ -CH1- Fc	Без линкера	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT2-Ig	VL ₁₇ -CL- линкер- VH ₂₀ -CH1- Fc	GSG	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT3-Ig	VL ₁₇ -CL- линкер- VH ₂₀ -CH1- Fc	GGGGS GS	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT4-Ig	VL ₁₇ -CL- VH ₂₀ -CH1- Fc	Без линкера			VH ₁₇ -CH1- VL ₂₀ -CL
FIT5-Ig	VL ₁₇ -CL- линкер-	GSG			VH ₁₇ -CH1- линкер-VL ₂₀ -
	VH ₂₀ -CH1- Fc				CL
FIT6-Ig	VL ₁₇ -CL- линкер- VH ₂₀ -CH1- Fc	GGGGS GS			VH ₁₇ -CH1- линкер-VL ₂₀ - CL

[00147] Для клонирования конструкции №2 LY VH-CH1 амплифицировали путем ПЦР с использованием прямых праймеров, гибридизирующих с сигнальным пептидом тяжелой цепи, и обратного праймера, гибридизирующего с С-концом CH1. ПЦР-продукт разделяли на агарозном геле до клонирования в вектор для экспрессии в клетках 293.

[00148] Для клонирования конструкции №3 легкую цепь 15D2 амплифицировали путем ПЦР с использованием прямого праймера, гибридизирующего с N-концом сигнального пептида легкой цепи, и обратного праймера, гибридизирующего с концом CL. ПЦР-продукт разделяли на агарозном геле до клонирования в вектор для экспрессии в клетках 293.

[00149] Для клонирования конструкции №4 LY VH-CH1 амплифицировали путем ПЦР с использованием прямого праймера, гибридизирующего с N-концом сигнального

пептида тяжелой цепи, и обратного праймера, гибридизующегося с концом CH1. 15D2 VL амплифицировали с использованием праймеров, гибридизующихся с концом 15D2 VL. Оба ПЦР-продукта разделяли на агарозном геле и объединяли с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами. Объединенный ПЦР-продукт разделяли на агарозном геле клонировали в вектор для экспрессии в клетках 293. В Таблице 2 показаны последовательности ПЦР-праймеров, использованных для описанного выше клонирования.

Таблица 2. ПЦР-праймеры, использованные для молекулярного конструирования FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/CD20

P1: 5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAG 3'	SEQ ID NO. 1
P2: 5'GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCACCACCACACTCTCCCC TGTTGAAGC 3'	SEQ ID NO. 2
P3: 5' GGTGGTGGCGGTTTCAGGCTCTCAGGTCCAGCTTGTGCAATCTG GCGCCGAGG3'	SEQ ID NO. 3
P4: 5' GTCTGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG 3'	SEQ ID NO. 4
P5: 5' TAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC 3'	SEQ ID NO. 5
P6: 5' CGGCGCCAGATTGCACAAGCTGGACCTGGCCTGAACCACACTC TCCCCTGTTGAAGCTC3'	SEQ ID NO. 6
P7: 5' GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCACCACCACACTCTCCCCCT GTTGAAGC3'	SEQ ID NO. 7
P8: 5' GGTGGTGGCGGTTTCAGGCTCTCAGGTCCAGCTTGTGCAATCTG GCGCCGAGG3'	SEQ ID NO. 8
P9: 5' TACCTCGGCGCCAGATTGCACAAGCTGGACCTGACACTCTCCC CTGTTGAAGCTCTTTG3'	SEQ ID NO. 9
P10: 5' CATGACACCTTAACAGAGGCCCCAGGTCGTTTTACCTCGGCGC CAGATTGCACAAG3'	SEQ ID NO. 10

P11: 5' CAATAAGCTTTACATGACACCTTAACAGAGGCCCCAG3'	SEQ ID NO. 11
P12: 5' TCGAGCGGCCGCTCAACAAGATTTGGGCTCAACTTCTTG3'	SEQ ID NO. 12
P13: 5'GCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGCTATACAGTTGACACAGTC3'	SEQ ID NO. 13
P14: 5' GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGCTTGATCTCTACCTTTGTTC3'	SEQ ID NO. 14

[00150] Полученные в результате последовательности hTL-17/hTL-20 FTT1-Ig, FTT2-Ig, FIT3-Ig, FTT4-Ig, FTT5-Ig и FIT6-Ig приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
ПОЛИПЕПТИД FIT1-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECQVQLVQSGAEVVKRPGASVKV

Белок	Идентификатор	Последовательность
Область белка	последовательности	12345678901234567890
		SCKASGYTFTNDIIHWVRQAPGQRLEWMG WINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDTASTA YMEISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPH DYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер		Отсутствует
15D2 VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTF TNDIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN

Белок Область белка	Идентифи катор последова тельности	Последовательность 12345678901234567890
		TQYSQNFQDRVSITRDTASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGMDV WGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT1-Ig №2, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDVAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		SEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT1-Ig №3, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT2-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К	SEQ ID NO.:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		
		12345678901234567890
ИЛ-17/ИЛ-20		FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGSGQVQLVQSGAEVKRPGAS VKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQAPGQRLE WMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT ASTAYMELISLRSEDVAVYYCAREPLWFGE SSPHDYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

Белок Область белка	Идентифи катор последова тельности	Последовательность 12345678901234567890
Линкер	SEQ ID NO.:26	GSG
15D2 VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYTF TNDIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TQYSQNFQDRVSITRDTASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGMDV WGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT2-Ig №2, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTAYMELSSLR SEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH

Белок Область белка	Идентифи катор последова тельности	Последовательность 12345678901234567890
		KPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDТАVYYCARYDYFTGTGVYWGQGTЛV TVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT2-Ig №3, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGGTKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
		HQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT3-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVH SRGNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGGSGSQVQLVQSGAEVVKR PGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQAPG QRLEWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSIT RDTASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPL WFGESSPHDYYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVH SRGNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFI

Белок	Идентификатор	Последовательность
Область белка	последовательности	12345678901234567890
		GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
15D2 VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTF TNDIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TQYSQNFQDRVSITRDTASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGMDV WGQGTTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Белок Область белка	Идентифи катор последова тельности	Последовательность 12345678901234567890
ПОЛИПЕПТИД FIT3-Ig №2, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDVAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
LY VH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDVAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLTV TVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT3-Ig №3, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*
15D2 VL	SEQ ID	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA

Белок	Идентификатор	Последовательность
Область белка	последовательности	12345678901234567890
	NO.:24	LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGTKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT4-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECQVQLVQSGAEVKRPGASVKV SCKASGYTFTNDIIHWVRQAPGQRLEWMG WINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDTASTA YMEISLRSEDTAVYYCAREPLWFGESSPH DYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		
		12345678901234567890
		CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VI.DSDGSFFLYSKI.TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVH SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер		Отсутствует
15D2 VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTF TNDIIIWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TQYSQNFQDRVSITRDTASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGMDV WGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPEL.LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPRFEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

10

15

20

25

30

35

40

45

Белок Область белка	Идентифи- катор последова- тельности	Последовательность 12345678901234567890
		NTKVDKKVEPKSC
Линкер		отсутствует
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGTKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT5-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVII SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGSGQVQLVQSGAEVKRPGAS VKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQAPGQRLE WMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSITRDT ASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPLWFGF SSPHDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		KPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLT'VLIIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSC'SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVH SRGNTYLHWYI.QKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPTFTGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT IIQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер	SEQ ID NO.:26	GSG
15D2 VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTF TNDIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TQYSQNFQDRVSITRDTASASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPHDYYGMDV WGQGTITVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS

Белок Область белка	Идентифи- катор последова- тельности	Последовательность 12345678901234567890
		NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTIITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVI. DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT5-Ig №4, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:30	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYIIIWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SED TAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAV LQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCGSGAIQLTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPG KAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LILNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
LY VH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYIIIWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
CH1	SEQ ID NO.:19	SEDIAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Линкер	SEQ ID NO.:26	GSG
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT6-Ig №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLVHSRGNTYLHWYILQKPGQSPQLLIYKVSNRFIGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGSQVQLVQSGAEVKR

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		PGASVKVSCKASGYTFTNDIIHWVRQAPG QRI.FWMGWINAGYGNTQYSQNFQDRVSIT RDTASTAYMELISLRSEDTAVYYCAREPL WFGESSPIIDYYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVITFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVII SRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFI GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер		GGGGSGS
15D2 VH	SEQ ID	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTF

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
	NO.:18	TNDIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGN TQYSQNFQDRVSITRDTASTAYMELISLRS EDTAVYYCAREPLWFGESSPIIDYYGMDV WGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT6-Ig №4, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-17/ИЛ-20	SEQ ID NO.:31	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGSAIQLTQS PSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFG

Белок	Идентифи- катор	Последовательность
Область белка	последова- тельности	12345678901234567890
		GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
LY VH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSF TDYIIMHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYGT' TDYNQRFKGRVTITADESTSTAYMEISSLR SEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGTLV TVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVITFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Линкер	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGTKEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV' HQGLSSPVTKSFNRGEC*

Пример 1.2: экспрессия, очистка и анализ белков FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20:

[00151] Все ДНК-конструкции каждого FIT-Ig субклонировали в векторы на основе pBOS и секвенировали в целях обеспечения точности. Конструкцию №1, №2 и №3 каждого FIT-Ig (1, 2 и 3) или конструкцию №1 и №4 каждого FIT-Ig (4, 5 и 6) подвергали временной коэкспрессии с использованием гюлиэтиленimina (ПЭИ) в клетках 293Е. Вкратце, ДНК в среде для экспрессии FreeStyle™ 293 Expression Medium смешивали с ПЭИ в соотношении конечной концентрации ДНК к ПЭИ 1:2, инкубировали в течение 15 мин (не более, чем 20 мин) при комнатной температуре и затем добавляли к клеткам 293Е (1,0-1,2 × 10⁶/мл, жизнеспособность клеток > 95%) в концентрации 60 мкг ДНК/

120 мл культуры. Через 6-24 часа культивирования на шейкере к трансфецированным клеткам добавляли пептон в конечной концентрации 5% со встряхиванием при 125 об/мин при 37°C, 8% CO₂. На 6-7-е сутки супернатант собирали путем центрифугирования и фильтрации, а белок FIT-Ig очищали с использованием хроматографии на белке А (Pierce, Rockford, ИЛ) в соответствии с инструкциями производителя. Белки анализировали с помощью электрофореза в ДСП-ПААГ, а их концентрации определяли по поглощению A280 и с использованием ВСА (Pierce, Rockford, ИЛ).

[00152] Для экспрессии FIT1-Ig, FIT2-Ig и FIT3-Ig использовали разные молярные соотношения ДНК для 3 конструкций, включая соотношение конструкций №1:№2:№3 = 1:1:1, соотношение конструкций №1:№2:№3 = 1:1,5:1,5 и соотношение конструкций №1:№2:№3 = 1:3:3 (Таблица 4). Белки FIT-Ig очищали с использованием хроматографии на белке А. Выход очищенного белка (7-16 мг/л) был сопоставим с содержанием hIgG в среде для экспрессии для каждого белка. Состав и содержание очищенных FIT-Ig анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ как в восстанавливающих, так и невосстанавливающих условиях. В невосстанавливающих условиях FIT-Ig мигрировал в виде одной дорожки, соответствующей приблизительно 250 кДа. В восстанавливающих условиях при разгонке каждого из белков FIT-Ig получали две дорожки, одна дорожка с более высокой молекулярной массой относится к конструкции №1 приблизительно 75 кДа, и одна дорожка с более низкой молекулярной массой соответствует как конструкции №2, так и №3, которые перекрываются при приблизительно 25 КДа. Электрофорез в ДСН-ПААГ показал, что каждый FIT-Ig экспрессируется в виде одного продукта, и 3 полипептидные цепи эффективно объединяются в пары с образованием IgG-подобной молекулы. Размеры цепей, а также полноразмерных молекул белков FIT-Ig сопоставимы с рассчитанной для них молекулярной массой на основе аминокислотных последовательностей.

Таблица 4. Экспрессия и ЭХ-анализ белков FIT-Ig, специфичных по отношению к hIL-17/ИЛ-20

Белок FIT-Ig	Соотношение ДНК: Конструкция 1:2:3	Уровень экспрессии (мг/л)	Процентное содержание мономерной фракции в хроматографическом пике при ЭХ
FIT1-Ig	1:1:1	15,16	92,07
	1:1.5:1.5	14,73	95,49
	1:3:3	9,87	97,92
FIT2-Ig	1:1:1	15,59	90,92
	1:1.5:1.5	12,61	94,73
	1:3:3	7,03	97,29
FIT3-Ig	1:1:1	15,59	91,47
	1:1.5:1.5	15,16	94,08
	1:3:3	7,75	97,57

[00153] Для дополнительного изучения физических свойств FIT-Ig в растворе использовали эксклюзионную хроматографию (ЭХ) для анализа каждого белка. Для ЭХ-анализа FIT-Ig, очищенный FIT-Ig в PBS наносили на колонку TSKgel SuperSW3000, 300 × 4,6 мм (TOSON). Прибор для ВЭЖХ, Model U3000 (DIONEKC), использовали для ЭХ. Все белки определяли с использованием УФ-детекции при 280 нм и 214 нм.

Использовали изократическое элюирование со скоростью потока 0,25 мл/мин. Все 3 белка FIT-Ig характеризовались наличием одного основного пика, демонстрирующего физическую гомогенность в виде мономерных белков (Таблица 4). Соотношение конструкции №1:№2:№3 = 1:3:3 показало лучший мономерный профиль по результатам ЭХ для всех 3 белков FIT-Ig (Таблица 4).

[00154] В Таблице 4 также показано, что уровни экспрессии всех белков FIT-Ig сопоставимы с таковыми стандартных мАт, что означает, что FIT-Ig может быть экспрессирован эффективно в клетках млекопитающих. Для экспрессии FIT4-Ig FIT5-Ig и FIT6-Ig соотношение ДНК конструкции №1:№4 = 1:1, и уровень экспрессии находился в пределах 1-10 мг/л, и процентное содержание мономерной фракции в хроматографическом пике, которое было установлено с помощью ЭХ, находилось в пределах 58-76%. На основе результатов, полученных для этой конкретной комбинации мАт (LY и 15D2), конструкции FIT-Ig, состоящие из 3 полипептидов (FIT1-Ig, FIT2-Ig и FIT3-Ig), показали лучший профиль экспрессии, чем таковой конструкций FIT-Ig, состоящих из 2 полипептидов (FIT4-Ig, FIT5-Ig и FIT6-Ig), поэтому FIT1-Ig, FIT2-Ig и FIT3-Ig подвергались дополнительному анализу на предмет функциональных свойств.

Пример 1.3 Определение антигенсвязывающей аффинности FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

[00155] Кинетику связывания FIT-Ig pHIL-17 и pHIL-20 определяли с помощью

поверхностного плазмонного резонанса (Таблица 5) с использованием прибора Biacore X100 (Biacore AB, Уппсала, Швеция) с использованием HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20) при 25°C.

Вкратце, поликлональное козье антитело, специфическое по отношению к Fcγ-фрагменту IgG человека (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, ИЛ), непосредственно иммобилизовали по всей площади биосенсорного чипа CM5 для исследовательских целей с

использованием стандартного набора для присоединения через аминокгруппу в соответствии с инструкциями производителя. Образцы очищенного FIT-Ig разводили в забуференном HEPES солевом растворе для захвата по всей площади реакционных

поверхностей, содержащих козий IgG к Fc-фрагменту человека, и пропускали по реакционным матрицам со скоростью потока 5 мкл/мин. Константы скоростей ассоциации и диссоциации, K_{on} (M⁻¹ с⁻¹) и k_{off} (с⁻¹) определяли при постоянной скорости потока 30 мкл/мин. Константы скорости были получены путем проведения измерений

кинетики связывания при десяти разных концентрациях антигенов в пределах от 1,25 до 1000 нМ. Затем была рассчитана равновесная константа диссоциации (M) реакции

между FIT-Ig и белками-мишенями, исходя из кинетических констант скорости по следующей формуле: $KD = k_{off}/K_{on}$. Аликвоты образцов антигенов также одновременно пропускали через контрольную ячейку и реакционную поверхность чипа CM для

регистрации и вычитания любого неспецифического фонового связывания для удаления большинства изменений показателя преломления и неспецифического сигнала,

возникающего при протекании антигена. Поверхности подвергали регенерации путем двух последовательных пропусков 25 мл 10 mM Глицина (pH 1,5) со скоростью потока 10 мкл/мин. Поверхности с иммобилизованным антителом к Fc-фрагменту были

полностью регенерированы и полностью сохранили свойственную им способность к захвату на протяжении двенадцати циклов.

Таблица 5. Функциональные характеристики молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

мАт или FIT-Ig	Антиген	Кинетика связывания согласно Biacore			Нейтрализующая активность IC ₅₀ (пМ)
		k _{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{off} (c ⁻¹)	K _d (M)	
LY	hIL-17	8,24E-5	1,80E-5	2,18E-11	101
FIT1-Ig	hIL-17	1,07E+7	3,88E-5	3,64E-12	102
FIT2-Ig	hIL-17	9,24E+6	1,53E-5	1,65E-12	137
FIT3-Ig	hIL-17	8,71E+6	9,58E-6	1,10E-12	146
15D2	hIL-20	1,70E+6	8,30E-5	5,00E-11	50
FIT1-Ig	hIL-20	1,40E+6	3,82E-5	2,73E-11	54
FIT2-Ig	hIL-20	1,80E+6	3,50E-5	1,95E-11	50
FIT3-Ig	hIL-20	1,40E+6	3,82E-5	2,73E-11	72

[00156] Анализ Biacore свидетельствовал о том, что общие параметры связывания трех FIT-Ig с hIL-17 и hIL-20 были похожи, причем значения аффинности FIT-Ig были очень близки значениям родительского мАТ LY и 15D2, и не наблюдалось никакой утраты аффинности связывания по отношению к любым антигенсвязывающим доменам (Таблица 5).

[00157] В дополнение к этому, тетравалентное биспецифическое связывание антигена FIT-Ig также анализировали с помощью Biacore. Сначала осуществляли связывание FIT1-Ig с использованием козьего антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека на сенсорном чипе Biacore, а также пропускали первый антиген и наблюдали сигнал, свидетельствующий о связывании. По мере насыщения FIT1-Ig первым антигеном затем пропускали второй антиген и регистрировали второй сигнал. Это осуществляли либо путем пропуска сначала ИЛ-17, а затем ИЛ-20, либо путем пропуска сначала ИЛ-20, а затем ИЛ-17 для FIT2-Ig (Фигура 3). В любой последовательности было обнаружено биспецифическое связывание, и связывание обоих антигенов достигало насыщения при 25-30 RU. Подобные результаты были получены для FIT2-Ig и FIT3-Ig. Таким образом, каждый FIT-Ig был способен связывать оба антигена одновременно, будучи биспецифической тетравалентной молекулой.

[00158] Профиль экспрессии и свойства бивалентного связывания FIT-Ig ясно продемонстрировали, что в молекуле FIT-Ig оба домена VL-CL правильно соединялись с соответствующими доменами VH-CH1 с образованием 2 функциональных связывающих доменов, и они были экспрессированы в виде одного мономерного, тетравалентного и биспецифического полиоразмерного белка FIT-Ig. Это происходило в отличие от типа молекул мультивалентных антител (Miller and Presta, патент США

8722859), которые характеризовались свойствами тетравалентного, а не моноспецифического связывания с одним антигеном-мишенью.

Пример 1.4 Определение биологической активности FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

5 [00159] Биологическая активность FIT-Ig в отношении нейтрализации функции ИЛ-17 была оценена с использованием биоанализа GRO α . Вкратце, клетки Hs27 высевали в количестве 10000 клеток/50 мкл/лунка в 96-луночные планшеты. FIT-Ig или контрольное антитело к ИЛ-17 (25 мкл) добавляли в лунки в двух повторностях с начальной концентрацией 2,5 нМ с последующими серийными разведениями 1:2 до 5
10 пМ. Затем в каждую лунку добавляли ИЛ-17А (25 мкл). Конечная концентрация ИЛ-17А составляла 0,3 нМ. Клетки инкубировали при 37°C в течение 17 ч до сбора культурального супернатанта. Концентрации GRO- α в культуральных супернатантах измеряли с помощью набора human CACL1/GRO alpha Quantihine kit в соответствии с протоколом производителя (R&D системах).

15 [00160] Биологическая активность FIT-Ig в отношении нейтрализации функции ИЛ-20 была оценена с использованием анализа пролиферации клеток ИЛ-20К⁺ BAF3. Вкратце, 25 мкл рекомбинантного ИЛ-20 человека в концентрации 0,8 нМ добавляли в каждую лунку 96-луночных планшетов (конечная концентрация ИЛ-20 составляла 0,2 нМ). Антитело к ИЛ-20 или FIT-Ig, или другое контрольное антитело разводили до
20 400 нМ (рабочая концентрация составляла 100 нМ) с последующими 5-кратными серийными разведениями и добавляли в 96-луночные аналитические планшеты (25 мкл на лунку). Клетки BAF3, стабильно трансфицированные геном рецептора ИЛ-20, затем добавляли в каждую лунку в концентрации 10000 клеток/лунка в объеме 50 мкл ОБ/МИН1 1640 плюс 10% FBS, Гигромицин В в концентрации 800 мкг/мл, G418 в
25 концентрации 800 мкг/мл. Через 48 ч после инкубации 100 мкл буфера CellTiter-Glo Luminescent добавляли в каждую лунку. Содержимое перемешивали в течение 2 минут на орбитальном шейкере для индукции клеточного лизиса, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала. Уровень люминесценции определяли с помощью SpectraMax M5.

30 [00161] Как показано в Таблице 5, все FIT-Ig были способны к нейтрализации как hIL-20, так и hIL-17 со значениями аффинности, сходными с таковых родительских антител. На основе функционального анализа с использованием как Biacore, так и анализов на клетках по выявлению нейтрализующих антител, установлено, что все 3 FIT-Ig полностью сохраняют уровни активности родительских мАт. Не было выявлено
35 никаких значительных функциональных различий среди трех FIT-Ig, что означает, что присутствие линкера было необязательным, и что конструкция FIT-Ig обеспечивала достаточную гибкость и соответствующие размерные параметры для двойного связывания в отсутствие пептидного спейсера между 2 Fab-связывающими областями. Это происходило в отличие от DVD-типа молекул, в которых линкер между 2
40 вариабельными доменами на каждой из 2 полипептидных цепей требуется для сохранения уровней активности нижнего (второго) вариабельного домена.

Пример 1.5 Исследование стабильности FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

45 [00162] Образцы белка FIT1-Ig в цитратном буфере (pH=6,0) по отдельности инкубировали при постоянной температуре 4°C, 25°C и 40°C в течение 1 суток, 3 суток и 7 суток; аналогичным образом, образцы белка FIT1-Ig подвергали замораживанию-оттаиванию один, два или три раза. Фракционный состав интактного полноразмерного мономерного белка во всех образцах определяли с помощью ЭХ-ВЭЖХ, причем 10

мкг каждого образца белка вводили в колонку Ultimate 3000 HPLC equipping Superdex200 5/150 GL со скоростью потока 0,3 мл/мин в течение 15 мин, и регистрировали результаты измерений, а также анализировали с использованием программного обеспечения Chromeleon, поставляемого производителем. В Таблице 6 показано, что в этих условиях температурного воздействия сохранялась полноразмерная интактная мономерная молекула FIT-Ig и FIT3-Ig.

Таблица 6. Анализ стабильности FIT-Ig путем измерения процентного содержания полноразмерного мономерного белка в ЭХ фракциях

Темп. (°C)	Время (сутки)	FIT1-Ig	FIT3-Ig
4	0 (Начальный этап)	98,74	98,60
	1	98,09	97,78
	3	97,81	97,45
	7	97,63	97,65
25	1	99,00	98,26
40	3	99,00	98,01
	7	98,86	98,53
	1	98,95	98,50
	3	98,94	98,35
40	7	98,82	98,37
	1X замораживание-оттаивание	98,89	98,21
	2X замораживание-оттаивание	95,37	98,21
	3X замораживание-оттаивание	95,24	98,35

Пример 1.6 Исследование растворимости FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

[00163] Растворимость FIT1-Ig анализировали на основании преципитации в присутствии увеличивающейся концентрации PEG6000 (PEG6000 покупали от Shanghai lingfeng chemical reagent co.Ltd). Вкратце, растворимость белка в присутствии PEG6000 оценивали в зависимости от концентрации PEG6000 (0, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% и 30%). исследования растворимости проводили при температуре 25°C при pH раствора 6,0. Вкратце, белок преципитировали путем смешивания соответствующего количества забуференных стоковых растворов белка, PEG и буфера для получения требуемой концентрации компонентов, конечный объем доводили до 200 мкл, и концентрацию белка устанавливали на уровне 1,0 мг/мл. Конечные растворы тщательно перемешивали и уравнивали в течение 16 ч. После уравнивания растворы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин для разделения белкового преципитата.

Растворимость белка была оценена при 280 нм с использованием Spectra Max Plus384 (Molecular Device) и получена из значений абсорбции супернатанта и расчета концентрации на основе калибровочной кривой для определения концентрации белка (Фигура 4А). Также было проанализировано коммерческое антитело Ритуксан с использованием того же экспериментального метода при 3 разных условиях рН (Фигура 4В). Установлено, что растворимость белка зависит от условий рН, и что предсказанная растворимость FIT-Ig попадает в пределы растворимости моноклональных антител.

Пример 1.7 Исследование фармакокинетических свойств FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

[00164] Фармакокинетические свойства FIT-Ig оценивали на самцах крыс линии Спрэг-Дули (СД). Белки FIT-Ig вводили самцам крыс линии СД внутривенно в однократной дозе 5 мг/кг через канюлю, введенную в яремную вену, или под кожу на спине. Образцы сыворотки крови собирали через разные интервалы времени на протяжении 28 суток при серийном взятии образцов крови из хвостовой вены в различных временных точках - 0, 5, 15 и 30 мин; 1, 2, 4, 8 и 24 ч; и на 2, 4, 7, 10, 14, 21 и 28-е сутки; образцы анализировали на связывание ИЛ-17 и/или ИЛ-20 человека методом ИФА. Вкратце, планшеты для ИФА покрывали козьим антителом к биотину (5 мкг/мл, 4°C, на протяжении ночи), блокировали с использованием Superblock (Pierce) и инкубировали с биотинилированным ИЛ-17 человека (ИФА захвата ИЛ-17) или ИЛ-20 (ИФА захвата ИЛ-20) в концентрации 50 нг/мл в 10% Superblock ТТВ8 при комнатной температуре в течение 2 ч. Образцы сыворотки крови подвергали серийному разведению (0,5% сыворотка крови, 10% Superblock в ТТBS) и инкубировали в планшетах в течение 30 мин при комнатной температуре. Детекцию осуществляли с использованием меченого пероксидазой хрена козьего антитела к иммуноглобулину человека, а концентрации определяли при помощи калибровочных кривых с использованием четырехпараметрической логистической аппроксимации. У нескольких животных, особенно в группе с подкожным введением, отмечалось резкое снижение концентраций FIT-Ig через 10 суток, вероятно, из-за развития реакции на антитела человека. Этих животных исключали из итоговых расчетов. Значения фармакокинетических параметров определяли с помощью некомпартментной модели с использованием программного обеспечения WinNonlin (Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калиф.).

[00165] Исследование ФК-параметров на крысах, концентрации FIT1-Ig в сыворотке крови были очень похожими при определении двумя разными методами ИФА, что означает, что молекула была интактной и способной к связыванию обоих антигенов in vivo. При внутривенном введении FIT1-Ig характеризовался бифазным фармакокинетическим профилем, состоящим из фазы распределения с последующей фазой выведения, который был похож на ФК-профиль стандартной молекулы IgG. Фармакокинетические параметры, рассчитанные на основе двух разных аналитических методов, были очень похожими и показаны в Таблице 7. Клиренс FIT-Ig был низким (~12 мл/сутки/кг), причем низкий объем распределения ($V_{ss} \sim 130$ мл/кг) приводил к увеличению периода полувыведения ($T_{1/2} > 10$ суток). После подкожного введения FIT-Ig всасывался медленно, причем максимальная концентрация в сыворотке крови, равная приблизительно 26,9 мкг/мл, достигалась через 4 суток после введения. Конечный элиминационный период полувыведения составлял примерно 11 суток, а биодоступность при подкожном введении была близка 100%. Эти результаты продемонстрировали, что свойства FIT1-Ig очень похожи на свойства стандартной молекулы IgG in vivo, что свидетельствует о потенциале для его применения в терапевтических целях с использованием сопоставимых режимов дозирования.

[00166] Исследование фармакокинетики FIT-Ig продемонстрировало поразительное достижение в области разработки мультиспецифических Ig-подобных биопрепаратов. Система для исследования фармакокинетических параметров на крысах широко используется в фармацевтической промышленности для доклинической оценки терапевтических мАт и позволяет точно предсказать фармакокинетический профиль мАт у людей. Благодаря длительному периоду полувыведения и низкому клиренсу FIT-Ig становится возможным обеспечение терапевтического эффекта при хроническом применении при снижении частоты введения алогично терапевтическим мАт. В дополнение к этому, FIT-Ig, будучи на 100 кДа большим, чем IgG, как оказалось, проникал эффективно в ткани, исходя из его IgG-подобного параметра объема распределения, определенного из исследования ФК-параметров.

Таблица 7. Фармакокинетический анализ FIT1-Ig у крыс линии SD

	IV					
ФК- параметры	CL	Vss	Beta t _{1/2}	AUC	MRT	
Единица измерения	мл/сутки/кг	мл/кг	Сутки	Сутки*мкг/мл	Сутки	
ИФА ИЛ-17	12,2	131	10,8	411	10,7	
ИФА ИЛ-20	11,9	128	10,8	421	10,7	
	SC					
ФК- параметры	T _{макс}	C _{макс}	t _½	AUC _{INF}	CL/F	F
Единица измерения	Сутки	мкг/мл	Сутки	сутки*мкг/мл	мл/сутки/кг	%
ИФА ИЛ-17	4,00	26,9	11,0	406	12,4	103,5
ИФА ИЛ-20	4,00	23,1	10,4	350	14,3	86,4

Пример 1.8 Исследование создания стабильной линии клеток FIT-Ig CHO

[00167] Было установлено, что временно трансфецированные клетки 293Е успешно вырабатывают FIT-Ig. Для того чтобы дополнительно определить осуществимость производства FIT-Ig, проводили стабильную трансфекцию как клеточной линии CHO-DG44, так и CHO-S и последующую селекцию клонов, а также анализ выработки белка. Вкратце, клетки CHO трансфецировали путем электропорации с использованием 8×10^6 клеток в 400 мкл раствора для трансфекции и 20 мкг ДНК (для клеток CHO DG44) или 25 мкг ДНК (для клеток CHO-S), субклонировали в вектор Freedom pCHO (Life Technologies). Селекцию стабильной клеточной линии проводили с использованием стандартных методик. Вкратце, для селекции CHO-DG44 после трансфекции проводили

селекцию пула стабильных (-НТ/2Р/400G, где Р представляет собой мкг/мл Пуромидина, G представляет собой мкг/мл G418), и анализировали выработку белка с помощью ИФА содержания IgG. Проводили селекцию клеточных пулов с наибольшей продуктивностью и в дальнейшем амплифицировали на протяжении нескольких раундов с использованием увеличивающихся концентраций МТХ (50, 100, 200 и 500 нМ), затем проводили анализ выработки белка с помощью ИФА содержания IgG. Затем проводили селекцию клеточных пулов с наибольшей продуктивностью для субклонирования. Для селекции клеток СНО-S первую фазу селекции осуществляли в среде, содержащей 10Р/400G/100М (М представляет собой нМ МТХ), затем проводили анализ выработки белка. Затем проводили селекцию клеточных пулов с наибольшей продуктивностью и в дальнейшем осуществляли вторую фазу селекции либо в 30Р/400G/500М, либо 50Р/400G/1000М, затем оценивали выработку белка с помощью ИФА. Затем проводили селекцию клеточных пулов с наибольшей продуктивностью для субклонирования. Для анализа выработки белка полностью восстановленные клеточные пулы (жизнеспособность >90%) высевали в количестве 5×10^5 жизнеспособных клеток/мл (СНО DG44) или 3×10^5 жизнеспособных клеток/мл (СНО-S) с использованием 30 мл свежей среды (среда CD FortiСНО™ дополненная 6 мМ L-глутамин) в шейкерные флаконы объемом 125 мл. Клетки инкубировали на орбитальном шейкере при 37°C, 80% относительной влажности, 8% CO₂ и 130 об/мин. Образцы культур анализировали ежедневно или через регулярные интервалы времени (например, на 0-е, 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 12-е и 14-е сутки), чтобы определить плотность клеток, жизнеспособность и уровень выработки белка до тех пор, пока жизнеспособность культур не снижалась до 50% или по достижению 14-х суток культивирования. После получения образцов при необходимости в культуры добавляли глюкозу.

[00168] Общий процесс создания стабильной клеточной линии FIT1-Ig СНО в целом подобен процессу получения моноклональных антител в клетках СНО. Например, на протяжении анализа пула DG44 при 2Р/400G VCD продолжал увеличиваться до 10-12-х суток вплоть до примерно $1,3 \times 10^7$, тогда как жизнеспособность клеток сохранялась на уровне выше 80% вплоть до 13-14-х суток и уровень выработки достигал почти 40 мг/мл на 14-е сутки (Фигура 5А). После амплификации при 5Р/400G/50М уровень выработки достигал выше 50 мг/мл на 14-е сутки (Фигура 5В). В случае селекции клеток СНО-S титр достигал выше 200 мг/мл на протяжении фазы 1 селекции (Фигура 5С) и выше 370 мг/мл на фазе 2 селекции (Фигура 5D). Эти уровни выработки подобны таковым, что ранее отмечались при получении стандартных человеческих мАт в нашей лаборатории, что указывает на то, что FIT-Ig характеризуется мАт-подобной осуществимостью производства для применений в коммерческих целях.

Пример 2: Конструирование, экспрессия и очистка иммуноглобулина с tandemным расположением Fab-фрагментов (FIT-IG), специфичного по отношению к CD3/CD20

[00169] Чтобы продемонстрировать, способен ли FIT-Ig связываться с антигенами клеточной поверхности, была создана молекула FIT-Ig FIT7-18 и FIT8-Ig, специфичная по отношению к CD3/CD20, которая представляет собой состоящую из 3 полипептидов конструкцию, которая показана на Фигуре 1. Конструкция, использованная для создания FIT-Ig, способного к связыванию CD3 и CD20 клеточной поверхности, проиллюстрирована на Фигуре 1В. Вкратце, родительские мАт включали два высокоаффинных антитела, антитело к CD3 (ОКТ3) и антитело к CD20 (Офатумумаб). Для создания конструкции FIT7-Ig №1 VL-CL ОКТ3 был непосредственно слит (FIT7-Ig) или через линкер, состоящий из 7 аминокислот (FIT8-Ig), с N-концом тяжелой цепи

Офатумумаба (как показано в Таблице 8). Конструкция №2 представляет собой VH-CH1 ОКТ3, а третья конструкция представляет собой VL-CL Офатумумаба. Три конструкции для FIT-Ig были котрансфецированы в клетки 293, что приводило к экспрессии и секреции белков FIT-Ig. Подробно описанные методики ПЦР-клонирования описаны ниже:

Пример 2.1 молекулярное клонирование FIG-Ig, специфичного по отношению к CD3/CD20:

[00170] Были использованы аналогичные способы молекулярного клонирования, что и для FIT-Ig, специфичного по отношению к hIL-17/hIL-20.

Таблица 8. Молекулы и конструкции, специфичные по отношению к CD3/CD20 FIT-Ig.

Молекула FIT-Ig	Конструкция №1	Линкер	Конструкция №2	Конструкция №3
FIT7-Ig	VL _{CD3} -CL-VH _{CD20} -CH1-Fc	Без линкера	VH _{CD3} -CH1	VL _{CD20} -CL
FIT8-Ig	VL _{CD3} -CL-линкер-VH _{CD20} -CH1-Fc	GGGGSGS	VH _{CD3} -CH1	VL _{CD20} -CL

[00171] В Таблице 9 показаны последовательности ПЦР-праймеров, использованных для молекулярного конструирования, описанного выше.

Таблица 9. ПЦР-праймеры, использованные для молекулярного конструирования FIT-Ig, специфичного по отношению к ИЛ-17/ИЛ-20

5		SEQ ID NO.
	P4: GTCTGCGGCCGCTCATTACCCGGAGACAGGGAGAG	32
10	P12: TCGAGCGGCCGCTCAACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG	33
	P20: CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG	34
15	P22:GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGG	35
	P23: TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AG	36
20	P24: TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AA	37
25	P25:CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAAGTGCA GCTGGTGGAGTCTG	38
	P28: GCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGAAATTGTGTTGACACAG TC	39
30	P29: AAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTG TCC	40
35		

[00172] Полученные в результате последовательности FIT-Ig, специфичного по отношению к CD3/CD20, представлены в Таблице 10.

Таблица 10. Аминокислотные последовательности FIT-Ig, специфичного по отношению к CD3/CD20,

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
ПОЛИПЕПТИД FIT7-Ig №1, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба	SEQ ID NO.:41	QIVLTQSPAIMASAPGHEKVTMTCSASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWTYDTSKLASGVPA HFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQ WSSNPFTFGSGTKLEINRTVAAPSVFIFPPS DEQI.KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGHECEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAA SGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTIS WNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSPLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHIEDPEVKENWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		ALHNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3 VL	SEQ ID NO.:42	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA HFRGSGSGTSYSLTISGMEAFEDAATYYCQQ WSSNPFTFGSGTKLEIN
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
Линкер		отсутствует
VII Офатумумаба	SEQ ID NO.:43	EVQLVFSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFN DYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSIFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT7-Ig №2, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба	SEQ ID NO.:44	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF TRYTMIIHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGT NYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
ОКТ3 VH	SEQ ID NO.:45	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF TRYTMHWWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGT NYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT7-Ig №3, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба	SEQ ID NO.:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRIIYDASNRAITGIPA RFGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPITFGQGTRI.EIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
Офатумумаб VL	SEQ ID NO.:47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGRLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
ПОЛИПЕПТИД FIT8-Ig №1, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба	SEQ ID NO.:48	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLIEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKKSLYLQMNSLRPEIDTALYYCAKIDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
		SCDKTHTCPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRIPVTCVVVDVSHIEDPEVKINWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVESC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
VL OKT3	SEQ ID NO.:42	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA HFRGSGSGTSYSLTISGMEAFDAATYYCQQ WSSNPFTFGSGTKLEIN
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
Липкер	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
VH Офатумумаба		EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFN DYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
CH1	SEQ ID	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

Белок Область белка	Идентификатор последовательности	Последовательность 12345678901234567890
	NO.:19	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTIITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT8-Ig №2, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба	SEQ ID NO.:44	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF TRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYT NYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
VH ОКТ3	SEQ ID NO.:45	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF TRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYT NYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		GLYSLSVVVTVPSSTLGTQTYICNVNHNKPS NTKVDDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT8-Ig №3, состоящий из ОКТЗ/Офатумумаба	SEQ ID NO.:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQR SNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECS*
VI. Офатумумаба	SEQ ID NO.:47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQR SNWPITFGQGTRLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECS*

Пример 2.2 Экспрессия и очистка FIT-Ig, специфичного по отношению к CD3/CD20:

[00173] Все ДНК-конструкции каждого FIT-Ig субклонировали в векторы на основе pBOS и секвенировали в целях обеспечения точности. Конструкция №1, №2 и №3 каждого FIT-Ig подвергали временной коэкспрессии с использованием полиэтиленimina (ПЭИ) в клетках 293Е. Вкратце, ДНК в среде для экспрессии FreeStyle™ 293 Rexpression Medium смешивали с ПЭИ в соотношении конечной концентрации ДНК к ПЭИ 1:2, инкубировали в течение 15 мин (не более чем 20 мин) при комнатной температуре и затем добавляли к клеткам 293Е ($1,0-1,2 \times 10^6$ /мл, жизнеспособность клеток >95%) при 60 мкг ДНК/120 мл культуральной среды. Через 6-24 часа культивирования на шейкере, добавляли пептон к трансфецированным клеткам в конечной концентрации 5% со встряхиванием при 125 об/мин при 37°C, 8% CO₂. На 6-7-е сутки супернатант собирали путем центрифугирования и фильтрации, а белок FIT-Ig очищали с использованием хроматографии на белке А (Pierce, Rockford, ИЛ) в соответствии с инструкциями производителя. Белки анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и их концентрацию определяли по поглощению A280 и с использованием BCA (Pierce, Rockford, ИЛ) (Таблица 11).

Таблица 11. Экспрессия и ЭХ-анализ белков FIT-Ig, специфичных по отношению к CD3/CD20

Блок FIT-Ig	Соотношение ДНК: Конструкция 1:2:3	Уровень экспрессии (мг/л)	Процентное содержание мономерной фракции в хроматографическом пике при ЭХ
FIT7-Ig	1:3:3	21,3	99,53
FIT8-Ig	1:3:3	25,6	99,16

Пример 2.3 Уровни связывания молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CD3/CD20:

[00174] Связывание FIT-Ig, специфичного по отношению к CD3/CD20, с обеими мишенями анализировали с помощью FACS с использованием клеток Jurcat, которые экспрессируют CD3 на клеточной поверхности, а также клеток Raji, которые экспрессируют CD20 на клеточной поверхности. Вкратце, 5×10^5 клеток промывали в охлажденном на льду FBS и блокировали 2% FBS на льду в течение 1 ч. Клетки инкубировали с антителом, FIT-Ig (100 нМ), или изотипическим контролем на льду в течение 1 ч промывали 3 раза FBS. Добавляли вторичное антитело (козьи антитела к IgG человека, меченные Alexa Fluor 488, Invitrogen) и инкубировали с клетками на льду в течение 1 ч в темноте, затем промывали три раза FBS. Образцы анализировали с помощью FACS calibur. Связывание с клеточной поверхностью показывают, что как FIT7-Ig, так и FIT8-Ig были способны к связыванию с обоими антигенами клеточной поверхности CD3 и CD20 в зависимости от концентрации. По сравнению с уровнями связывания родительских мАт Интенсивность связывания FIT-Ig с CD3 на клетках Jurcat снижалась, по интенсивность связывания с CD20 на клетках Raji повышалась. Во всех исследованиях по связыванию отмечались аналогичные уровни связывания FIT7-Ig и FIT8-Ig с обоими антигенами, что свидетельствовало о том, что линкер не оказывал значительного влияния на способность связывания с FIT8-Ig (Таблица 12).

Таблица 12. Исследования связывания антигенов клеточной поверхности белками FIT-Ig, специфичными по отношению к CD3/CD20

Белок FIT-Ig	Антиген (клеточная линия)	Интенсивность связывания по результатам FACS (МНФ)
ОКТ3	CD3 (Jurkat)	399
FIT7-Ig		159
FIT8-Ig		211
Офатумумаб	CD20 (Raji)	181
FIT7-Ig		291
FIT8-Ig		274

Пример 3: Конструирование, экспрессия и очистка иммуноглобулина с tandemным расположением Fab-фрагментов (FIT-Ig), специфичного к ФНО/ИЛ-17

[00175] Также был создан другой FIT-Ig, который может связываться с ИЛ-17 человека и TNF α человека (FIT9-Ig) с использованием клона LY мАт, специфичного по отношению к ИЛ-17, и мАт Голимумаб, специфичного по отношению к ФНО, в виде 3-х полипептидных конструкций, которые показаны на Фигуре 1. Для создания конструкции FIT9-Ig №1, VL-CL Голимумаба был слит непосредственно с N-концом тяжелой цепи LY (как показано в Таблице 13). Конструкция №2 представляет собой VH-CH1 Голимумаба, а третья конструкция представляет собой VL-CL клона LY. Три конструкции для получения FIT9-Ig были котрансфецированы в клетки 293, что приводило к экспрессии и секреции белков FIT9-Ig. Полученные в результате последовательности FIT-Ig, специфичного по отношению к ФНО/ИЛ-17, представлены в Таблице 14.

Пример 3.1 молекулярное клонирование FIT-Ig, специфичного по отношению к ФНО/ИЛ-17:

[00176] Были использованы аналогичные способы молекулярного клонирования, что и для FIT-Ig, специфичного по отношению к hIL-17/hIL-20.

Таблица 13. Молекула FIT-Ig и конструкции, специфичные по отношению к ФНО/ИЛ-17.

Молекула FIT-Ig	Конструкция №1	Линкер	Конструкция №2	Конструкция №3
FIT9-Ig	VL _{TNF} -CL-VH _{IL-17} -CH1-Fc	Без линкера	VH _{TNF} -CH1	VL _{IL-17} -CL

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФНО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
ПОЛИПЕПТИД FIT9-IG №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-ФНО/ИЛ-17	SEQ ID NO.:87	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVYSYLA WYQKPGQAPRLLIYDAS NRAITGIPARFSGSGSID FTLTISSELEPEDFAVYYC QQRSNWPPFTFGPGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKIDSTY SLSSITLTLSKADYEKIIK VYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSCKASGY SFTDYHIHWVRQAPGQG LEWMGVINPMYGTIDY NQRFKGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYY CARYDYFTGTGVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTISGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTITCPPCPAPE

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФПО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
		ILGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGN VFSC'SVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
VL ГОЛИМУМАБА	SEQ ID NO.:88	FIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVYSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPPFTFGPGTKV DIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSITYSL STLTLISKADYEKHKVYA

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФПО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
		CEVTIIQGLSSPVTKSFNR GEC
Линкер		Отсутствует
LY VII	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYSTDYHI IIWVRQAPGQGLEWMG VINPMYGTTDYNQRFKG RVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARYDY FTGTGVYWGQGTILVTVS S
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPE PVTISWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSISSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPFLLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKT KPREFQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAK

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФНО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		
		GQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSEFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSL SPGK*
ПОЛИПЕПТИД №2 FIT9-IG, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФНО/ИЛ-17	SEQ ID NO.:89	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFISSYAMH WVRQAPGNGLEWVAFM SYDGSNKKYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWG QGTITVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGC LVKIDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKK VEPKSC
VN ГОЛИМУМАБА	SEQ ID NO.:90	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFISSYAMH WVRQAPGNGLEWVAFM SYDGSNKKYADSVKGRF

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФПО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		TISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWG QGTTVTVSS
СИ	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVEPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPE PVTISWNSGALTSGVHI FPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД №3 FIT9-IG, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЛ-ФНО/ИЛ-17	SEQ ID NO.:91	DIVMTQTPLSLSVTPGQP ASISCRSSRSLVHSRGNT YLHWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFIGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCSQSTIHLPIFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQP

Таблица 14: аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к ФНО/ИЛ-17

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		
		ASISCRSSRSLVIISRGNT YLHWYLLQKPGQSPQLLI YKVSNRFIGVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVIG VYYCSQSTIIIPFTFGQG TKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLS SLTTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*

Пример 3.2 Экспрессия, очистка и анализ белков FIT-Ig, специфичных по отношению к ФНО/ИЛ-17:

[00177] Все ДНК-конструкции каждого FIT-Ig субклонировали в векторы на основе рВОС и секвенировали в целях обеспечения точности. Конструкцию №1, №2 и №3 FIT9-Ig подвергали временной коэкспрессии с использованием полиэтилснимина (ПЭИ) в клетках 293Е, как было описано ранее, и белки FIT9-Ig очищали с использованием хроматографии на белке А. Уровень экспрессии составлял 10-23 мг/л. Очищенный белок подвергали функциональному анализу с использованием клеточной системы для ИЛ-17 (продукция GRO α клетками Hs27) и ФНО (продукция ИЛ-8 клетками L929). Нейтрализующая активность FIT9-Ig против ФНО человека составляла 11,6 пМ (по сравнению с 15,9 пМ для Голимумаба в том же самом эксперименте) и против ИЛ-17 человека составляла 122 пМ (по сравнению с 51,5 пМ для LY в том же самом эксперименте). В целом, FIT9-Ig сохранял биологическую активность, присущую родительским мАТ.

Пример 4: конструирование, экспрессия и очистка иммуноглобулина с tandemным расположением Fab-фрагментов (FIT-Ig), специфичного по отношению к CTLA-4/PD-1

[00178] Был создан другой FIT-Ig, который может связываться с CTLA-4 человека и PD-1 человека (FIT10-Ig) с использованием мАТ Ипилимумаб, специфичного по отношению к CTLA-4, и мАТ Ниволумаб, специфичного по отношению к PD-1, в виде 3-х полипептидных конструкций, которые показаны на Фигуре 1. Для создания конструкции FIT10-Ig №1, VL-CL Ипилимумаба был слит непосредственно с N-концом тяжелой цепи Ниволумаба (как показано в Таблице 15). Конструкция №2 представляет собой VH-CH1 Ипилимумаба, а третья конструкция представляет собой VL-CL Ниволумаба. Три конструкции для получения FIT10-Ig были котрансфицированы в

клетки 293, что приводило к экспрессии и секреции белков FIT10-Ig.

Пример 4.1 молекулярное клонирование FIT-Ig, специфичного по отношению к CTLA-4/PD-1:

[00179] Были использованы аналогичные способы молекулярного клонирования, что и для FIT-Ig, специфичного по отношению к hIL-17/hIL-20. Полученные в результате последовательности FIT-Ig, специфичного по отношению к CTLA-4/PD-1, представлены в Таблице 16.

Таблица 15. Молекула FIT-Ig и конструкции, специфичный по отношению к CTLA-4/PD-1.

Молекула FIT-Ig	Конструкция №1	Липкер	Конструкция №2	Конструкция №3
FIT10-Ig	VL _{CTLA-4} -CL-VH _{PD-1} -CH1-Fc	Без линкера	VH _{CTLA-4} -CH1	VL _{PD-1} -CL

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
ПОЛИПЕПТИД FIT10-IG №1, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К CTLA- 4/PD-1	SEQ ID NO.:92	EIVLTQSPGTLISLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRIILYGA FSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSITY SLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTK SFNRGECQVQLVESGGG VVQPGRSLRLDCKASGIT FSNSGMHWVRQAPGKG LEWVAVIWDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNKNT

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
		LFLQMNSLRAEDTAVYY CATNDDYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGIYFP SDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSL SPGK*
VI. ИПИЛИМУМАБА	SEQ ID NO.:93	FIVI.TQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRIILIYGA FSRATGIPDRFSGSGSGT

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
CI.	SEQ ID NO.:17	DFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKV EIK RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSIYSL STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSENR GEC
Линкер		Отсутствует
VH ПИВОЛУМАБА	SEQ ID NO.:94	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLDCKASGITFSNSGM HWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSKRYYADSVKG RFTISRDN SKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCATNDD YWGQGT LTVVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHK

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
		PSNTKVDDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVIINAKT KPREEQYNSTYRVVSVL TVLIHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRIEE MTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVI.DSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCS VMIEALHNIITYTQKSLSL SPGK*
ПОЛИПЕПТИД FIT10-IG №2, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К CTLA- 4/PD-1	SEQ ID NO.:95	QVQLVESGGGVVQPGRS LRI.SCAASGFTSSYTMH WVRQAPGKGLEWVTFIS YDGNKKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAIYYCARTGWL GPFIDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTF

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		
		PAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSC
ВН ИЛИЛИМУМАБА	SEQ ID NO.:96	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYTMII WVRQAPGKGLEWVTFIS YDGNKKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAIYYCARTGWL GPFDYWGQGTLVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
ПОЛИПЕПТИД FIT10-IG №3, СПЕЦИФИЧНЫЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К CTLA- 4/PD-1	SEQ ID NO.:97	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRAIGIPARFSGSGSGFD FTLTISLEPEDFAVYYC QQSSNWPRTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYP

Таблица 16. Аминокислотные последовательности молекул FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
Область белка		
		REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC*
VL НИВОЛЮМАБА	SEQ ID NO.:98	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRAITGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELPEDFAVYYC QQSSNWPRITFGQGTKVE IK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*

Пример 4.2 Экспрессия, очистка и функциональный анализ белков FIT-Ig, специфичных по отношению к CTLA-4/PD-1:

[00180] Все ДНК-конструкции каждого FIT-Ig субклонировали в векторы на основе pBOS и секвенировали в целях обеспечения точности. Конструкцию №1, №2 и №3 FIT10-Ig подвергали временной коэкспрессии с использованием полиэтилен и мина (ПЭИ) в клетках 293Е, как было описано ранее, и белки FIT9-Ig очищали с использованием хроматографии на белке А до получения 98% мономерного полноразмерного белка. Уровни экспрессии составляли вплоть до 43 мг/л. Очищенный белок подвергали анализу связывания с использованием ИФА против рскомбинантных CTLA-4Ig и PD1. Вкратце, для связывания с CTLA-4, CTLA-4Ig человека (R&D Системах) иммобилизовали на 96-луночных планшетах с последующими стандартными процедурами отмывки и блокировки. Затем в планшеты добавляли FIT-10-Ig или Ипилимумаб в различных концентрациях с последующей инкубацией и многочисленными этапами отмывки, и детектировали с использованием меченого пероксидазой хрена антитела к Fab-фрагменту человека. Для связывания с PD-1, PD-1 человека (с his-меткой) (R&D Системах) иммобилизовали на 96-луночных планшетах с последующими стандартными процедурами отмывки и блокировки. Затем в планшеты добавляли FIT-10-Ig или

Ниволумаб в различных концентрациях с последующей инкубацией и многочисленными этапами отмывки, и детектировали с использованием меченого пероксидазой хрена антитела к Fc-фрагменту человека (Фигура 6). Установлено, что FIT10-Ig был способен к связыванию как CTLA-4 (A), так и PD-1 (B) с подобными уровнями активности, что и родительские мАт Ипилимумаб и Ниволумаб, соответственно.

[00181] В дополнение к этому, было проведено исследование по множественному связыванию антигенов с использованием OctetRed, чтобы определить был ли FIT10-Ig способен к связыванию рскомбинантных CTLA-4 и PD-1 одновременно. Вкратце, FIT10-Ig иммобилизовали на сенсор AR2G в концентрации 10 мкг/мл с последующим связыванием CTLA-4Ig, а затем PD-1 (или сначала PD-1, а затем CTLA-4Ig) в реакционном буфере (FBS pH 7,4, 0,1% BSA, 0,02% Tween) в концентрации 80 нМ. По окончании эксперимента поверхность регенерировали с использованием 10 мМ глицина при pH 1,5 пять раз (Фигура 7). Этот эксперимент показывает, что FIT10-Ig был способен к связыванию PD-1, после того, как он уже связался с CTLA-4, и наоборот, что означает, что FIT10-Ig был способен к связыванию как CTLA-4Ig, так и PD-1 одновременно.

[00182] Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, процитированные в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы о каждой отдельной публикации, патентной заявке или выданном патенте были специально и отдельно указано, что они включены посредством ссылки в полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЭПИМАБ БИОТЕРЕПЬЮТИКС

У, Чэнбинь

<120> ИММУНОГЛОБУЛИН С ТАНДЕМНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ FAB-ФРАГМЕНТОВ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

<130> EPVI-001/01WO

<150> PCT/CN2013/090923

<151> 2013-12-30

<160> 98

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотидный праймер

<400> 1

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa g

31

<210> 2

<211> 51

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотидный праймер

<400> 2

gctggacctg agagcctgaa ccgcccaccac cacactctcc cctgttgaag c

51

<210> 3

<211> 52

<212> ДНК

	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 3	
5	ggtggtggcg gttcaggctc tcagggtccag cttgtgcaat ctggcgccga gg	52
	<210> 4	
	<211> 36	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 4	
	gtctgcggcc gctcatttac ccggaagacag ggaagag	36
	<210> 5	
15	<211> 31	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
20	<400> 5	
	taagcgtacg gtggctgcac catctgtctt c	31
	<210> 6	
	<211> 59	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 6	
	cgccgssaga ttgcasaagc tggacctggc ctgaaccaca ctctcccctg ttgaagctc	59
30	<210> 7	
	<211> 51	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 7	
	gctggacctg agagcctgaa ccgcccaccac cacactctcc cctgttgaag c	51
	<210> 8	
	<211> 52	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 8	
45	ggtggtggcg gttcaggctc tcagggtccag cttgtgcaat ctggcgccga gg	52
	<210> 9	
	<211> 59	
	<212> ДНК	

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Олигонуклеотидный праймер
 <400> 9
 5 tacctcggcg ccagattgca caagctggac ctgacactct cccctgttga agctctttg 59
 <210> 10
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Олигонуклеотидный праймер
 <400> 10
 catgacacct taacagaggc cccaggctcgt ttacactcgg cgccagattg cacaag 56
 <210> 11
 15 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Олигонуклеотидный праймер
 20 <400> 11
 caataagctt tacatgacac cttaacagag gccccag 37
 <210> 12
 <211> 40
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Олигонуклеотидный праймер
 <400> 12
 tctagcggcc gctcaacaag atttgggctc aactttcttg 40
 30 <210> 13
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Олигонуклеотидный праймер
 <400> 13
 gctgctgctg tggttccccg gctcgcgatg cgctatacag ttgacacagt c 51
 <210> 14
 <211> 53
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Олигонуклеотидный праймер
 <400> 14
 45 gaagatgaag acagatgggtg cagccaccgt acgcttgatc tctacctttg ttc 53
 <210> 15
 <211> 676
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид FIT1-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20

<400> 15

5	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5				10					15		
	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	His	Ser
				20				25					30			
	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
10			35				40					45				
	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ile	Gly	Val	Pro
		50				55					60					
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65				70				75					80		
15	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser
				85				90					95			
	Thr	His	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110			
	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
20			115					120					125			
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
		130					135				140					
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	145				150				155					160		
25	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175		
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190			
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
30			195				200					205				
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val
		210				215					220					
	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser
	225				230				235					240		
35	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile	Ile	His	Trp	Val
				245					250					255		
	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala
			260					265					270			
	Gly	Tyr	Gly	Asn	Thr	Gln	Tyr	Ser	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Arg	Val	Ser
40			275				280					285				
	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ile	Ser
		290				295					300					
	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Pro	Leu
	305				310				315					320		
45	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	His	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp
				325				330				335				
	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			340					345					350			

RU 2 769 133 C2

	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
			355					360					365			
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
			370					375				380				
5	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
						390					395					400
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
					405					410					415	
	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
10					420				425					430		
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
			435					440					445			
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
			450				455					460				
15	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
						470					475					480
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
					485					490						495
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
20				500					505					510		
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				515					520					525		
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				530			535					540				
25	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
						550					555					560
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
					565					570					575	
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
30				580					585					590		
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
			595					600					605			
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
			610				615					620				
35	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
						630					635					640
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
					645					650					655	
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
40				660					665					670		
	Ser	Pro	Gly	Lys												
				675												
	<210>	16														
	<211>	112														
45	<212>	NPPT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	16														
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly

RU 2769133 C2

1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
5 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
10 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 17
15 <211> 107
<212> IPT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
20 1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
25 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
30 85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 18
<211> 127
35 <212> IPT
<213> Mus sp.
<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp
20 25 30
Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe
45 50 55 60
Gln Asp Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

RU 2769133 C2

				85					90					95		
	Ala	Arg	Glu	Pro	Leu	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	His	Asp	Tyr	Tyr
				100					105					110		
	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
5				115				120						125		
	<210>	19														
	<211>	103														
	<212>	IIPT														
	<213>	Homo sapiens														
10	<400>	19														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1			5					10					15		
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
15	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				35				40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				50				55					60			
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
20	65					70					75				80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95		
	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys									
				100												
25	<210>	20														
	<211>	227														
	<212>	IIPT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	20														
30	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	1			5					10					15		
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				20					25					30		
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
35				35				40					45			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
				50				55					60			
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	65					70					75				80	
40	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				100					105					110		
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
45				115				120					125			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				130				135					140			
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu

RU 2 769 133 C2

	145		150		155		160
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				165		170	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
5			180			185	
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			195			200	
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
			210			215	
10	Pro	Gly	Lys				
	225						
	<210>	21					
	<211>	222					
	<212>	ПРТ					
15	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Полипептид FIT1-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20					
	<400>	21					
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser
20	1		5			10	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys
			20			25	
	His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln
			35			40	
25	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Met	Tyr
			50			55	
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr
	65					70	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg
30			85			90	
	Ala	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Thr
			100			105	
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			115			120	
35	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
			130			135	
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
	145					150	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
40			165			170	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			180			185	
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
			195			200	
45	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			210			215	
	<210>	22					
	<211>	119					

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 22

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
10 Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
15 85 90 95
Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 23

<211> 214

<212> ППТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <223> Полипептид FIT1-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20

<400> 23

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
30 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
40 100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
45 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
5 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 24
<211> 107
<212> ПРТ
10 <213> Mus sp.
<400> 24
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
15 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
25 100 105
<210> 25
<211> 679
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<223> Полипептид FIT2-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20
<400> 25
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
35 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
40 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
45 Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

RU 2 769 133 C2

	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130						135					140				
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	145					150					155					160
5	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
					165					170					175	
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
				180					185					190		
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
10			195				200						205			
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Ser	Gly	Gln	Val
	210					215						220				
	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val
	225				230					235						240
15	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile	Ile
				245					250						255	
	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp
			260					265						270		
	Ile	Asn	Ala	Gly	Tyr	Gly	Asn	Thr	Gln	Tyr	Ser	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp
20		275					280					285				
	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
	290					295						300				
	Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
	305				310				315							320
25	Glu	Pro	Leu	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	His	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Met
				325					330						335	
	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
			340				345							350		
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
30		355					360						365			
	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
	370					375					380					
	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
	385				390						395					400
35	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				405					410						415	
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
			420				425						430			
	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu
40		435					440						445			
	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
	450					455					460					
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
	465				470					475						480
45	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				485				490						495		
	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			500					505						510		

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
515 520 525
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
530 535 540
5 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
545 550 555 560
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575
10 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
580 585 590
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620
15 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
625 630 635 640
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
20 660 665 670
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675
<210> 26
<211> 3
25 <212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> последовательность пептидного линкера
<400> 26
30 Gly Ser Gly
1
<210> 27
<211> 683
<212> ПРТ
35 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Полипептид FIT3-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20
<400> 27
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
40 1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
45 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

RU 2 769 133 C2

	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser
				85						90					95	
	Thr	His	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
5	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
				115					120					125		
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
				130					135					140		
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
10				145					150				155			160
	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
					165					170					175	
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
				180						185					190	
15	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
				195					200					205		
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				210					215					220		
	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Arg	Pro
20				225								235				240
	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
					245						250				255	
	Asn	Asp	Ile	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu
					260					265					270	
25	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Tyr	Gly	Asn	Thr	Gln	Tyr	Ser	Gln
				275						280					285	
	Asn	Phe	Gln	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr
				290						295				300		
	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
30				305							315					320
	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Pro	Leu	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	His	Asp
					325						330				335	
	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
				340						345					350	
35	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
				355						360				365		
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
				370						375				380		
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
40				385								395				400
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
					405						410				415	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
					420					425					430	
45	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
				435						440				445		
	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
				450					455					460		

	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	465					470					475					480
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
					485					490						495
5	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
					500					505					510	
	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
					515					520				525		
	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
10		530					535					540				
	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
	545				550					555						560
	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
					565					570					575	
15	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
					580					585				590		
	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
					595					600				605		
	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
20		610					615						620			
	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	625				630					635						640
	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
					645					650					655	
25	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
					660					665					670	
	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
					675				680							
	<210>	28														
30	<211>	7														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	последовательность пептидного линкера														
35	<400>	28														
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser									
	1				5											
	<210>	29														
	<211>	436														
40	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Полипептид FIT4-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20														
	<400>	29														
45	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
	1				5				10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr
					20				25				30			

RU 2 769 133 C2

	His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Met	Tyr	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	
			50				55					60					
5	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
10				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
15	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
20				180					185				190				
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Ala	Ile	
		210				215						220					
25	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	
	225					230					235					240	
	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	
					245					250					255		
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	
30				260				265						270			
	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	
		275					280					285					
	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	
		290				295						300					
35	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	
	305					310					315					320	
	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	
					325					330				335			
	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	
40				340				345						350			
	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	
		355					360						365				
	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	
		370				375						380					
45	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	
	385					390					395					400	
	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	
					405					410				415			

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
420 425 430
Arg Gly Glu Cys
435
5 <210> 30
<211> 439
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
10 <223> Полипептид FIT5-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20
<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
15 20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
20 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
25 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
30 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
35 180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
210 215 220
40 Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
225 230 235 240
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
245 250 255
Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
45 260 265 270
Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
275 280 285
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

RU 2 769 133 C2

	290		295		300	
	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro					
	305		310		315	320
	Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala					
5		325		330		335
	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser					
		340		345		350
	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu					
		355		360		365
10	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser					
		370		375		380
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu					
	385		390		395	400
	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val					
15		405		410		415
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys					
		420		425		430
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
		435				
20	<210> 31					
	<211> 443					
	<212> ПРТ					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
25	<223> Полипептид FIT6-Ig, специфичный по отношению к IL-17/IL-20					
	<400> 31					
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
	1	5		10		15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr					
30		20		25		30
	His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
		35		40		45
	Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe					
		50		55		60
35	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr					
	65		70		75	80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90		95
	Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly					
40		100		105		110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe					
		115		120		125
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu					
		130		135		140
45	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp					
	145		150		155	160
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu					
		165		170		175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
5 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
210 215 220
Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
225 230 235 240
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
10 245 250 255
Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
260 265 270
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro
275 280 285
15 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
290 295 300
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
305 310 315 320
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
20 325 330 335
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
340 345 350
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
355 360 365
25 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
370 375 380
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
385 390 395 400
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
30 405 410 415
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
420 425 430
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
435 440
35 <210> 32
<211> 36
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
40 <223> Олигонуклеотидный праймер
<400> 32
gtctgcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag
<210> 33
<211> 40
45 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Олигонуклеотидный праймер

	<400> 33	
	tcgagcggcc gctcaacaag atttgggctc aactttcttg	40
	<210> 34	
	<211> 22	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 34	
10	caggtccagc tgcagcagtc tg	22
	<210> 35	
	<211> 59	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
15	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 35	
	gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggg	59
	<210> 36	
20	<211> 50	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
25	<400> 36	
	tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag	50
	<210> 37	
	<211> 50	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 37	
	tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	50
35	<210> 38	
	<211> 59	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<223> Олигонуклеотидный праймер	
	<400> 38	
	ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtgaa gtgcagctgg tggagtctg	59
	<210> 39	
	<211> 51	
45	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Олигонуклеотидный праймер	

<400> 39
gctgctgctg tgggttccccg gctcgcgatg cgaaattgtg ttgacacagt c 51
<210> 40
<211> 52
5 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Олигонуклеотидный праймер
<400> 40
10 aagatgaaga cagatgggtgc agccaccgta cgtttaatct ccagtcgtgt cc 52
<210> 41
<211> 665
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
15 <220>
<223> Полипептид FIT7-Ig, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба
<400> 41
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
20 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
25 50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95
30 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
35 130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
40 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
45 210 215 220
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
225 230 235 240
Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

RU 2 769 133 C2

					245					250				255			
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	
					260					265				270			
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
5					275					280				285			
	Lys	Lys	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
					290					295				300			
	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Ile	Gln	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	
	305					310					315					320	
10	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
					325					330					335		
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
					340					345				350			
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
15					355					360				365			
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
					370					375				380			
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
	385					390					395					400	
20	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
					405					410					415		
	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
					420					425				430			
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
25					435					440				445			
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
					450					455				460			
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
	465					470				475						480	
30	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
					485					490					495		
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
					500					505				510			
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
35					515					520				525			
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
					530					535				540			
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
	545					550				555						560	
40	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
					565					570					575		
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
					580					585				590			
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
45					595					600				605			
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					610					615				620			
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	

RU 2 769 133 C2

	625		630		635		640
	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln						
		645		650		655	
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys						
5		660		665			
	<210>	42					
	<211>	106					
	<212>	IIPT					
	<213>	Mus sp.					
10	<400>	42					
	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly						
	1	5		10		15	
	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met						
		20		25		30	
15	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr						
		35		40		45	
	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser						
		50		55		60	
	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu						
20	65	70		75		80	
	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr						
		85		90		95	
	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn						
		100		105			
25	<210>	43					
	<211>	122					
	<212>	IIPT					
	<213>	Homo sapiens					
	<400>	43					
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg						
	1	5		10		15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr						
		20		25		30	
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val						
35		35		40		45	
	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val						
		50		55		60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr						
	65	70		75		80	
40	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys						
		85		90		95	
	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp						
		100		105		110	
	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser						
45		115		120			
	<210>	44					
	<211>	222					
	<212>	IIPT					

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полипептид FIT7-Ig, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба

<400> 44

5 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 10 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 15 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 20 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 25 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 30 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 45

<211> 119

35 <212> ПРТ

<213> Mus sp.

<400> 45

40 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 45 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
5 115
<210> 46
<211> 214
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> Полипептид FIT7-Ig, состоящий из ОКТЗ/Офатумумаба
<400> 46
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
20 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95
25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
30 130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
35 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
40 210
<210> 47
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens
45 <400> 47
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 5 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 48
 <211> 672
 <212> ПРТ
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид FIT8-Ig, состоящий из ОКТ3/Офатумумаба
 <400> 48
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 20 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 25 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 30 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 35 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 40 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 45 Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu
 210 215 220
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
 225 230 235 240

RU 2 769 133 C2

	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr	Ala	Met	His	Trp
					245					250					255	
	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser
				260					265						270	
5	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
				275				280						285		
	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Lys	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn
				290			295					300				
	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Ile
10	305					310					315					320
	Gln	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				325						330					335	
	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
				340					345						350	
15	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
				355				360					365			
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
				370			375					380				
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
20	385					390				395						400
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				405						410					415	
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
				420					425				430			
25	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				435				440					445			
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				450			455						460			
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
30	465					470					475					480
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
				485						490					495	
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
				500					505					510		
35	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
				515				520					525			
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				530			535					540				
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
40	545					550					555					560
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
				565						570					575	
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				580					585					590		
45	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
				595				600					605			
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
				610			615					620				

	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
	625						630				635					640
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
							645				650					655
5	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
							660				665					670
	<210>	49														
	<211>	3														
	<212>	ПРТ														
10	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	последовательность пептидного линкера														
	<400>	49														
	Gly	Gly	Ser													
15	1															
	<210>	50														
	<211>	3														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
20	<220>															
	<223>	последовательность пептидного линкера														
	<400>	50														
	Ser	Gly	Gly													
	1															
25	<210>	51														
	<211>	3														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
30	<223>	последовательность пептидного линкера														
	<400>	51														
	Gly	Gly	Gly													
	1															
	<210>	52														
35	<211>	4														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	последовательность пептидного линкера														
40	<400>	52														
	Gly	Gly	Gly	Ser												
	1															
	<210>	53														
	<211>	4														
45	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	последовательность пептидного линкера														

<400> 53
 Ser Gly Gly Gly
 1
 <210> 54
 5 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 10 <400> 54
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 55
 <211> 8
 15 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 55
 20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 56
 <211> 10
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 56
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 30 1 5 10
 <210> 57
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 57
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 58
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 58
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 59
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 1 5 10 15
 10 Val
 <210> 60
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 60
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 1 5
 20 <210> 61
 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 61
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 62
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 35 <400> 62
 Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val
 1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 6
 40 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 63
 45 Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 1 5
 <210> 64
 <211> 10

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 5 <400> 64
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 6
 10 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 65
 15 Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5
 <210> 66
 <211> 9
 <212> ПРТ
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 66
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 25 1 5
 <210> 67
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 67
 Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10
 35 <210> 68
 <211> 27
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 68
 Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 45 20 25
 <210> 69
 <211> 6
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 69
 5 Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 1 5
 <210> 70
 <211> 10
 <212> ПРТ
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 70
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 15 1 5 10
 <210> 71
 <211> 18
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 71
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 25 Arg Val
 <210> 72
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 72
 Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5
 35 <210> 73
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 73
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 1 5 10
 <210> 74
 45 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> последовательность пептидного линкера
 <400> 74
 Thr Val Ala Ala Pro
 1 5
 5 <210> 75
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 75
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10
 <210> 76
 15 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 20 <400> 76
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 1 5
 <210> 77
 <211> 13
 25 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 77
 30 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 6
 <212> ПРТ
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 78
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 40 1 5
 <210> 79
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 79
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

	1	5	10
	<210>	80	
	<211>	6	
	<212>	ПРТ	
5	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	последовательность пептидного линкера	
	<400>	80	
	Ala Lys Thr Thr Ala Pro		
10	1	5	
	<210>	81	
	<211>	13	
	<212>	ПРТ	
	<213>	Искусственная последовательность	
15	<220>		
	<223>	последовательность пептидного линкера	
	<400>	81	
	Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro		
	1	5	10
20	<210>	82	
	<211>	6	
	<212>	ПРТ	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
25	<223>	последовательность пептидного линкера	
	<400>	82	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
	1	5	
	<210>	83	
30	<211>	13	
	<212>	ПРТ	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	последовательность пептидного линкера	
35	<400>	83	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
	1	5	10
	<210>	84	
	<211>	15	
40	<212>	ПРТ	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	последовательность пептидного линкера	
	<400>	84	
45	Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser		
	1	5	10 15
	<210>	85	
	<211>	15	

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 5 <400> 85
 Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser
 1 5 10 15
 <210> 86
 <211> 15
 10 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> последовательность пептидного линкера
 <400> 86
 15 Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 87
 <211> 664
 <212> ПРТ
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Полипептид FIT9-Ig, специфичный по отношению к TNF/IL-17
 <400> 87
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 25 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 30 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 35 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 40 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 45 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

RU 2769133 C2

		195		200		205											
		Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala
		210						215					220				
		Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
5		225				230						235				240	
		Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
					245					250					255		
		Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Met	Tyr	Gly	Thr
				260					265					270			
10		Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp
		275						280					285				
		Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu
		290						295				300					
		Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Thr	Gly	Thr
15		305				310					315					320	
		Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
					325					330					335		
		Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
				340				345				350					
20		Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			355					360				365					
		Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
		370						375			380						
		His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
25		385				390					395					400	
		Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
					405					410					415		
		Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
				420				425			430						
30		Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
			435					440			445						
		Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
		450						455			460						
		Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
35		465				470					475					480	
		Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
					485					490					495		
		Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				500				505			510						
40		Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
			515					520			525						
		Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
		530						535			540						
		Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
45		545				550					555					560	
		Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
					565					570					575		
		Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser

580 585 590
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 595 600 605
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 5 610 615 620
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 625 630 635 640
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 645 650 655
 10 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660
 <210> 88
 <211> 108
 <212> ПРТ
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
 20 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 30 100 105
 <210> 89
 <211> 229
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Полипептид FIT9-Ig, специфичный по отношению к TNF/IL-17
 <400> 89
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 45 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

RU 2 769 133 C2

				85					90					95		
	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
				100					105					110		
	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
5				115				120					125			
	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
				130				135					140			
	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
	145					150					155					160
10	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
					165					170					175	
	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
				180					185					190		
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
15				195				200					205			
	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
			210				215					220				
	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
	225															
20	<210>	90														
	<211>	126														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	90														
25	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1			5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30			
	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
30			35				40					45				
	Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55						60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65				70				75						80	
35	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95			
	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
			100					105					110			
	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
40			115				120						125			
	<210>	91														
	<211>	219														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
45	<220>															
	<223>	Полипептид FIT9-Ig, специфичный по отношению к TNF/IL-17														
	<400>	91														
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly

RU 2 769 133 C2

	1		5		10		15									
	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	His	Ser
				20				25					30			
	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
5			35					40					45			
	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ile	Gly	Val	Pro
			50					55					60			
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65						70					75				80
10	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser
				85						90					95	
	Thr	His	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
15			115					120					125			
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			130					135					140			
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	145						150				155					160
20	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165						170					175	
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
				180					185					190		
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
25			195					200					205			
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
			210					215								
	<210>	92														
	<211>	658														
30	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Полипептид FIT10-Ig, специфичный по отношению к CTLA-4/PD-1														
	<400>	92														
35	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Ser	Ser
				20						25				30		
	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
40			35					40					45			
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Phe	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
			50					55					60			
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
	65					70					75					80
45	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
				85						90				95		
	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
				100						105				110		

RU 2 769 133 C2

	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
				115				120					125				
	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
				130			135					140					
5	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
	145					150				155						160	
	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
					165				170						175		
	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
10				180					185					190			
	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
				195				200					205				
	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	
				210			215					220					
15	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Cys	Lys	Ala	Ser	
	225					230					235					240	
	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn	Ser	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
					245					250					255		
	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	
20				260				265					270				
	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	
				275				280					285				
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
				290			295				300						
25	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
	305					310					315					320	
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
					325				330						335		
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
30				340				345						350			
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
			355				360						365				
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				370			375					380					
35	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
	385					390					395					400	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				405					410					415			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
40				420					425					430			
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
				435				440					445				
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				450			455					460					
45	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
	465					470					475					480	
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
					485				490						495		

RU 2769133 C2

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 500 505 510
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 515 520 525
 5 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 530 535 540
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 10 565 570 575
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 580 585 590
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 595 600 605
 15 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 610 615 620
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 625 630 635 640
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 20 645 650 655
 Gly Lys
 <210> 93
 <211> 108
 <212> IPT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 93
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
 30 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 40 100 105
 <210> 94
 <211> 113
 <212> IPT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

		20		25		30											
		Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35							40					45			
		Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
5		50						55					60				
		Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
		65					70				75					80	
		Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85						90				95		
10		Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
					100					105					110		
		Ser															
		<210>	95														
		<211>	221														
15		<212>	ПРТ														
		<213>	Искусственная последовательность														
		<220>															
		<223>	Полипептид FIT10-Ig, специфичный по отношению к CTLA-4/PD-1														
		<400>	95														
20		Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
		1				5					10				15		
		Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
					20					25					30		
		Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
25					35				40					45			
		Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50						55					60				
		Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
		65					70				75					80	
30		Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
					85						90				95		
		Ala	Arg	Thr	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100					105					110		
		Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
35					115					120				125			
		Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
					130				135				140				
		Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
		145					150					155				160	
40		Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
					165					170					175		
		Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
					180					185					190		
		Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
45					195				200					205			
		Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
					210				215					220			
		<210>	96														

<211> 118
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens
 <400> 96

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 10 35 40 45
 Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

20 115
 <210> 97
 <211> 214
 <212> ППТ
 <213> Искусственная последовательность

25 <220>
 <223> Полипептид FIT10-Ig, специфичный по отношению к CTLA-4/PD-1
 <400> 97

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 30 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 40 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 45 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

```

                165                170                175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
                180                185                190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
5      195                200                205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210
<210> 98
<211> 107
10    <212> PPT
      <213> Homo sapiens
      <400> 98
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
15    Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
20      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
      85      90      95
25    Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

(57) Формула изобретения

1. Связывающий белок, содержащий три полипептидные цепи, причем:

30 первая полипептидная цепь содержит, от amino-конца к карбоксильному концу, либо (i) VL_A -CL- VH_B -CH1-Fc, где CL слит непосредственно с VH_B , либо (ii) VH_B -CH1- VL_A -CL-Fc, где CH1 слит непосредственно с VL_A , и при этом между переменными доменами и константными доменами нет встроенных линкеров;

при этом вторая полипептидная цепь содержит, от amino-конца к карбоксильному 35 концу, VH_A -CH1, при этом между VH_A и CH1 нет встроенных линкеров;

при этом третья полипептидная цепь содержит, от amino-конца к карбоксильному концу, VL_B -CL, при этом между VL_B и CL нет встроенных линкеров;

при этом А представляет собой первый эпитоп или антиген, и В представляет собой 40 второй эпитоп или антиген, и при этом А и В являются разными эпитопами одного антигена или разными антигенами;

причем VL_A представляет собой переменный домен легкой цепи первого 45 родительского антитела, которое связывается с А, CL представляет собой константный домен легкой цепи антитела, VH_B представляет собой переменный домен тяжелой цепи второго родительского антитела, которое связывается с В, CH1 представляет собой первый константный домен тяжелой цепи антитела, VH_A представляет собой переменный домен тяжелой цепи указанного первого родительского антитела, которое связывается с А, и VL_B представляет собой переменный домен легкой цепи указанного

второго родительского антитела, которое связывается с В; и

при этом две из указанных первых полипептидных цепей, две из указанных вторых полипептидных цепей и две из указанных третьих полипептидных цепей способны ассоциировать с образованием тетравалентного связывающего белка с двойной специфичностью, содержащего шесть полипептидных цепей, содержащих четыре функциональных связывающих участка Fab, и при этом указанный связывающий белок связывает как эпитоп или антиген А, так и эпитоп или антиген В.

2. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что Fc представляет собой Fc IgG1 человека.

3. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что Fc соответствует SEQ ID NO: 20.

4. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что Fc представляет собой вариант Fc.

5. Связывающий белок по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию пар цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-1 α и ИЛ-1 β ; ИЛ-12 и ИЛ-18; TNF α и ИЛ-23; TNF α и ИЛ-13; ФНО и ИЛ-18; ФНО и ИЛ-12; ФНО и ИЛ-1-бета; ФНО и MIF; ФНО и ИЛ-6; ФНО и рецептора ИЛ-6; ФНО и ИЛ-17; ИЛ-17 и ИЛ-20; ИЛ-17 и ИЛ-23; ФНО и ИЛ-15; ФНО и VEGF; VEGFR и EGFR; ИЛ-13 и ИЛ-9; ИЛ-13 и ИЛ-4; ИЛ-13 и ИЛ-5; ИЛ-13 и ИЛ-25; ИЛ-13 и TARC; ИЛ-13 и MDC; ИЛ-13 и MIF; ИЛ-13 и TGF- β ; ИЛ-13 и агонист LHR; ИЛ-13 и CL25; ИЛ-13 и SPRR2a; ИЛ-13 и SPRR2b; ИЛ-13 и ADAM8; и TNF α и PGE4; ИЛ-13 и PED2; ФНО и PEG2.

6. Связывающий белок по п. 5, отличающийся тем, что указанный связывающий белок связывает ИЛ-17 человека и ИЛ-20 человека.

7. Связывающий белок по п. 6, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит переменные тяжелые и легкие цепи, полученные из антитела LY к ИЛ-17 и антитела 15D2 к ИЛ-20, где VH антитела LY имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, а VL антитела LY имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

8. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21; и третью полипептидную цепь, содержащую последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23.

9. Связывающий белок по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию пар мишеней, выбранных из группы, состоящей из CD138 и CD20; CD138 и CD40; CD19 и CD20; CD20 и CD3; CD3 и CD33; CD16 и CD33; CD3 и CD133; CD38 и CD138; CD38 и CD20; CD20 и CD22; CD38 и CD40; CD40 и CD20; CD-8 и ИЛ-6; CSPG и RGM A; CTLA-4 и BTNO2; IGF1 и IGF2; IGF1/2 и ErbB2; IGF-1R и EGFR; EGFR и CD13; IGF-1R и ErbB3; EGFR-2 и IGFR; VEGFR-2 и Met; VEGF-A и Ангиопоэтина-2 (Ang-2); ИЛ-12 и TWEAK; ИЛ-13 и ИЛ-1-бета; MAG и RGM A; NgR и RGM A; NogoA и RGM A; OMGr и RGM A; PD-L1 и CTLA-4; PD-1 и CTLA-4; PD-1 и TIM-3; CD137 и CD20; CD137 и EGFR; CD137 и Her-2; CD137 и PD-1; CD137 и PD-L1; VEGF и PD-L1; Lag-3 и TIM-3; OX40 и PD-1; TIM-3 и PD-L1; EGFR и DLL-4; PDGFR и VEGF; EpCAM и CD3; Her2 и CD3; CD19 и CD3; EGFR и Her3; CD16a и CD30; CD30 и PSMA; EGFR и CD3; CEA и CD3; TROP-2 и HSG; TROP-2 и CD3; VEGF и EGFR; HGF и VEGF; VEGF и VEGF (другим эпитопом); EGFR и cMet; PDGF и VEGF; VEGF и DLL-4;

OX40 и PD-L1; ICOS и PD-1; ICOS и PD-L1; Lag-3 и PD-1; Lag-3 и PD-L1; Lag-3 и CTLA-4; ICOS и CTLA-4; CD47 и CD20; RGM A и RGM B; Te38 и TNF α ; TNF α и Blys; TNF α и CD-22; TNF α и домен CTLA-4; TNF α и GP130; TNF α и ИЛ-12p40; и TNF α и лиганд RANK.

10. Связывающий белок по п. 9, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию CD3 человека и CD20 человека.

11. Связывающий белок по п. 10, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит вариабельные тяжелые и легкие цепи, полученные из антитела ОКТ3 к CD3 и антитела офатумумаб к CD20.

12. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 44; и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46.

13. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на CTLA-4.

14. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на PD-1.

15. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на белке, который представляет собой белок иммунных контрольных точек на Т-клетках.

16. Связывающий белок по п. 15, отличающийся тем, что белок иммунных контрольных точек выбран из группы, состоящей из TIM-3, Lag3, ICOS, BTLA, CD160, 2B4, KIR, CD137, CD27, OX40, CD40L и A2aR.

17. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию одного или более эпитопов на белке, который вовлечен в реализацию функций иммунных контрольных точек.

18. Связывающий белок по п. 17, отличающийся тем, что указанный белок выбран из группы, состоящей из PD-L1, PD-L2, Галектина-9, HVEM, CD48, B7-1, B7-2, ICOSL, B7-H3, B7-H4, CD137L, OX40L, CD70 и CD40.

19. Связывающий белок по любому из пп. в 1-18, отличающийся тем, что указанный связывающий белок связывается с каждым антигеном с подобной или большей степенью аффинности по сравнению с моноспецифическим антителом или фрагментом антитела.

20. Конъюгат, содержащий связывающий белок по любому из пп. 1-19, конъюгированный со средством, выбранным из группы, состоящей из молекулы иммуноадгезии, средства для визуализации, терапевтического средства и цитотоксического средства.

21. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 87; вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 89; и третью полипептидную цепь, содержащую последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 91.

22. Связывающий белок по п. 5, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию ФНО человека и ИЛ-17 человека.

23. Связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что указанный связывающий белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 92; вторую полипептидную цепь,

содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95; и третью полипептидную цепь, содержащую последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 97.

24. Связывающий белок по п. 9, отличающийся тем, что указанный связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 человека и PD-1 человека.

25. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из ревматоидного артрита, псориаза, остеопороза, инсульта, заболевания печени и рака ротовой полости, содержащая связывающий белок по п. 1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, где указанный связывающий белок способен к связыванию ИЛ-17 и ИЛ-20.

26. Фармацевтическая композиция для лечения В-клеточного рака, содержащая связывающий белок по п. 1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, где указанный связывающий белок способен к связыванию CD3 и CD20.

27. Фармацевтическая композиция по п. 26, отличающаяся тем, что В-клеточный рак выбран из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфобластного лейкоза/лимфомы из В-клеток-предшественников, опухолей из зрелых В-клеток, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, В-клеточной лимфомы маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркита, плазмацитомы, плазмноклеточной миеломы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства, макроглобулинемии Вальденстрема и анапластической крупноклеточной лимфомы.

28. Фармацевтическая композиция для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, содержащая связывающий белок по п. 1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, где указанный связывающий белок способен к связыванию ФНО и ИЛ-17.

29. Фармацевтическая композиция по п. 28, отличающаяся тем, что аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, псориаза (включая бляшечный псориаз), артрита (включая ревматоидный артрит, псориатический артрит, остеоартрит или идиопатический артрит), множественного склероза, анкилозирующего спондилита, деформирующей артропатии, системной красной волчанки, увеита, сепсиса, нейродегенеративных заболеваний, регенерации нейронов, повреждения спинного мозга, первичных и метастатических раковых заболеваний, респираторного нарушения - астмы, аллергической и неаллергической астмы, астмы, вызванной инфекцией, астмы, вызванной инфекцией респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), заболевания, характеризующегося воспалением дыхательных путей, эозинофилии, фиброза и избыточной выработки слизи, кистозного фиброза, фиброза легких, атопического заболевания, атопического дерматита, крапивницы, экземы, аллергического ринита, аллергического гастроэнтерита, воспалительного и/или аутоиммунного заболевания кожи, воспалительного и/или аутоиммунного заболевания органов желудочно-кишечного тракта, воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), язвенного колита, воспалительного и/или аутоиммунного заболевания печени, цирроза печени, фиброза печени, фиброза печени, вызванного вирусом гепатита В и/или С, склеродермы, опухолей или злокачественных новообразований, гепатоклеточной карциномы, глиобластомы, лимфомы, лимфомы Ходжкина, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, паразитарной инфекции,

инфекции HTLV-1, подавления защитных иммунных реакций типа 1 и подавления проявления защитной иммунной реакции типа 1 на протяжении вакцинации.

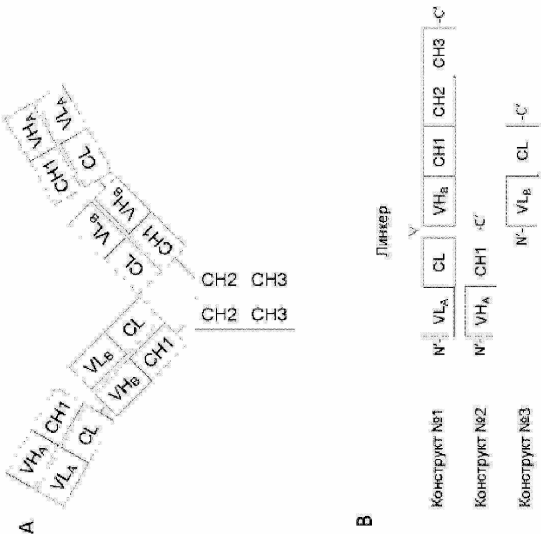
30. Фармацевтическая композиция по п. 29, отличающаяся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, системную красную волчанку или множественный склероз.

31. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая связывающий белок по п. 1 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, где указанный связывающий белок способен к связыванию CTLA-4 и PD-1.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, отличающаяся тем, что рак представляет собой меланому, рак почек, рак предстательной железы, аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, рак пищевода, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак печени, рак яичников, рак шейки матки, рак щитовидной железы, глиобластому, глиому, лейкоз, лимфому или другие злокачественные новообразования.

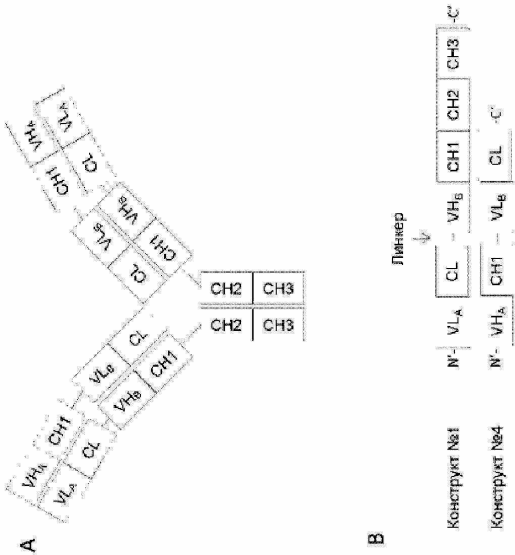
1

Фиг. 1

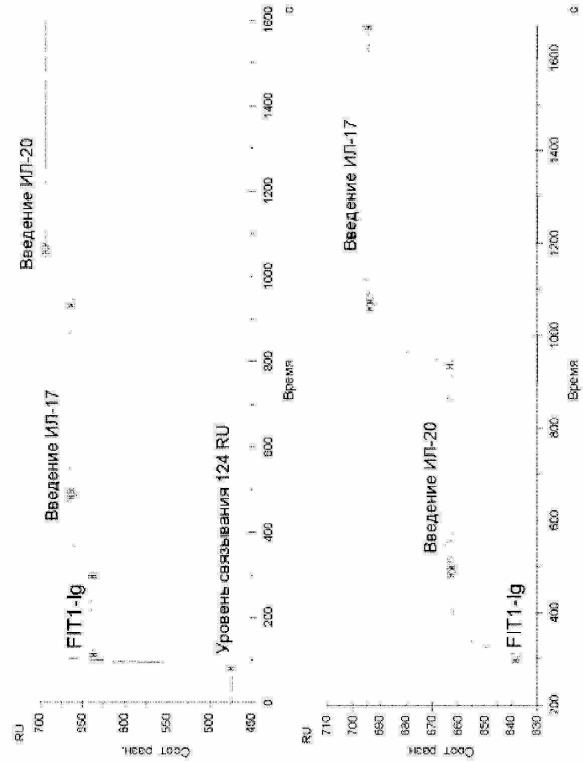


2

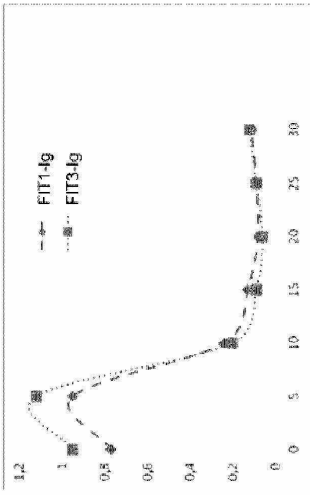
Фиг. 2



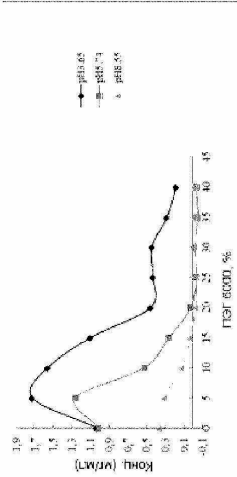
Фиг. 3



А. ПЭГ-индуцированная преципитация FIT-Ig

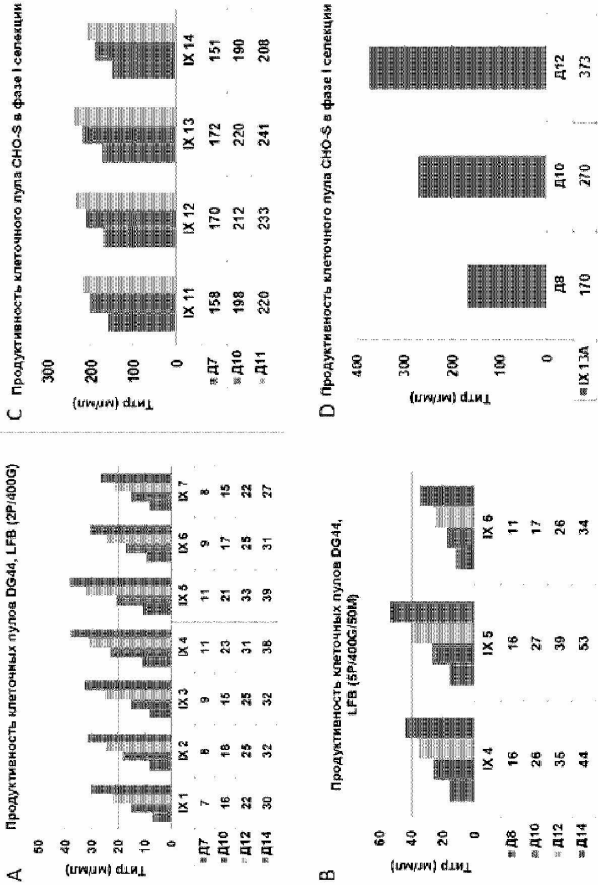


В. ПЭГ-индуцированная преципитация Ригуксана



Фиг. 4

Фиг. 5



Д: Дни IX 1-15; число клонов

Фиг. 6

