



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/47 (2020.02); C07K 16/2878 (2020.02); C07K 16/32 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017135596, 04.05.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.05.2016

Дата регистрации:
21.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

04.05.2015 ЕР 15166179.0;

18.05.2015 ЕР 15167917.2;

17.09.2015 ЕР 15002702.7;

04.11.2015 ЕР 15192870.2;

11.01.2016 ЕР 16150705.8;

15.04.2016 ЕР 16000862.9

(43) Дата публикации заявки: 04.06.2019 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 21.07.2020 Бюл. № 21

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.12.2017

(86) Заявка РСТ:

ЕР 2016/060041 (04.05.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2016/177802 (10.11.2016)

Адрес для переписки:

123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -
патентные поверенные"

(72) Автор(ы):

ХИННЕР Марлон (DE),

РОТЕ Кристине (DE),

ОЛЬВИЛЬ Шейн (DE),

БЕЛ АЙБА Рачида Сихам (DE),

МЁБИУС Ульрих (DE),

ШЛОССЕР Коринна (DE),

ЖАКЕН Томас Жан (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ПИЕРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС ГМБХ
(DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2636342 C2, 22.11.2017. WO
2009156456 A1, 30.12.2009.

(54) СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД С ПРОТИВОРАКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к слитому полипептиду, специфичному в отношении как CD137, так и HER2/neu, при этом слитый полипептид может быть применимым для направления образования скоплений и активации CD137 в отношении HER2/neu-положительных

опухолевых клеток. Такой слитый полипептид можно быть использован во многих фармацевтических путях применения, например, в качестве противораковых средств и/или иммуномодуляторов для лечения или предупреждения заболеваний человека, таких как

ряд опухолей. Настоящее раскрытие также касается способов получения слитого полипептида, описанного в данном документе, а также композиций, содержащих такой слитый полипептид. Настоящее раскрытие дополнительно относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим такой слитый полипептид, и к способам получения такого

слитого полипептида и молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, в данной заявке раскрываются пути применения в терапии и/или диагностике такого слитого полипептида, а также композиций, содержащих один или более таких слитых полипептидов. 14 н. и 29 з.п. ф-лы, 24 ил., 9 табл., 20 пр.

R U 2 7 2 7 1 6 5 C 2

R U 2 7 2 7 1 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C07K 16/32* (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/47 (2020.02); *C07K 16/2878* (2020.02); *C07K 16/32* (2020.02); *A61K 39/395* (2020.02); *A61P 35/00* (2020.02)

(21)(22) Application: **2017135596, 04.05.2016**

(24) Effective date for property rights:
04.05.2016

Registration date:
21.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:

04.05.2015 EP 15166179.0;**18.05.2015 EP 15167917.2;****17.09.2015 EP 15002702.7;****04.11.2015 EP 15192870.2;****11.01.2016 EP 16150705.8;****15.04.2016 EP 16000862.9**(43) Application published: **04.06.2019 Bull. № 16**(45) Date of publication: **21.07.2020 Bull. № 21**(85) Commencement of national phase: **04.12.2017**

(86) PCT application:

EP 2016/060041 (04.05.2016)

(87) PCT publication:

WO 2016/177802 (10.11.2016)

Mail address:

**123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, d. 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennye"**

(72) Inventor(s):

HINNER Marlon (DE),**ROTHER Christine (DE),****OLWILL Shane (DE),****BEL AIBA Rachida Siham (DE),****MOEBIUS Ulrich (DE),****SCHLOSSER Corinna (DE),****JAQUIN Thomas Jean (DE)**

(73) Proprietor(s):

PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH (DE)(54) **FUSED POLYPEPTIDE WITH ANTICANCER ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a fused polypeptide specific for both CD137 and HER2/neu, wherein the fused polypeptide can be used to guide formation of clusters and activation of CD137 with respect to HER2/neu-positive tumor cells. Present disclosure also relates to methods of producing a fused

polypeptide described herein, as well as compositions containing such a fused polypeptide. Present disclosure further relates to nucleic acid molecules encoding such a fused polypeptide, and to methods of producing such a fused polypeptide and nucleic acid molecules. Present invention also discloses methods of using such a fused polypeptide in therapy and/or diagnostics, as well as

compositions containing one or more such fused polypeptides.

EFFECT: such fused polypeptide can be used in many pharmaceutical routes of use, for example as

anticancer agents and/or immunomodulators for treating or preventing human diseases, such as a number of tumors.

43 cl, 24 dwg, 9 tbl, 20 ex

R U 2 7 2 7 1 6 5 C 2

R U 2 7 2 7 1 6 5 C 2

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] HER2/neu является представителем семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека. Как было показано амплификация или сверхэкспрессия этого онкогена играет важную роль в развитии и прогрессировании ряда опухолей, в том числе определенных агрессивных типов рака молочной железы. Как было показано, HER2/neu крайне неодинаково экспрессируется на опухолевых клетках с намного более высокой плотностью на поверхности клетки по сравнению со здоровой тканью.

[0002] Трастузумаб (продаваемый под названием Herceptin®), моноклональное антитело, целенаправленно воздействующее на HER2/neu, показано для лечения женщин либо с HER2(+) раком молочной железы на ранней стадии, либо с метастатическим HER2(+) раком молочной железы. Несмотря на перспективную активность моноклональных антител, таких как трастузумаб, в этих условиях, значения частоты ответа среди пациентов либо с раком, не поддающимся лечению, либо с раком на поздней стадии являются недостаточно оптимальными. Например, хотя частота объективного ответа выросла в значительной степени в клиническом испытании в сравнении только химиотерапии с химиотерапией и трастузумабом - с 32% до 50% - все еще остается другая половина включенных пациентов, у которых отсутствует ответ (Slamon D.J. et al., N Engl J Med. 2001 Mar 15; 344(11): 783-92). Следовательно, необходимы лучшие типы терапии, целенаправленно воздействующей на HER2/neu, с повышенной частотой ответа.

[0003] CD137 является костимулирующим иммунным рецептором и представителем надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Он, в основном, экспрессируется на активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, активированных В-клетках и клетках естественных киллеров (NK), но его также можно обнаружить на находящихся в покое моноцитах и дендритных клетках (Li, S. Y. et al., Clin Pharmacol 2013 5(Suppl 1): 47-53) или эндотелиальных клетках (Snell, L. M. et al., Immunol Rev 2011 Nov; 244(1): 197-217). CD137 играет важную роль в регуляции иммунных ответов, и таким образом является мишенью для иммунотерапии рака. Лиганд CD137 (CD137L) является единственным известным естественным лигандом CD137, и он постоянно экспрессируется на некоторых типах APC, таких как активированные В-клетки, моноциты и дендритные клетки в селезенке, и его можно индуцировать на Т-лимфоцитах.

[0004] CD137L представляет собой тримерный белок, который существует в виде мембраносвязанной формы и в виде растворимого варианта. Однако способность растворимого CD137L активировать CD137, например на экспрессирующих CD137 лимфоцитах, ограничена, и для вызова эффекта необходимы большие концентрации (Wyzgol, A. et al., J Immunol 2009 Aug 1; 183(3): 1851-1861). Естественный путь активации CD137 представляет собой активацию посредством связывания CD137-положительной клетки с CD137L-положительной клеткой. Как полагают, активация CD137 затем индуцируется путем образования скоплений с помощью CD137L на противоположной клетке, приводя к передаче сигнала через TRAF1, 2 и 3 (Snell, L. M. et al., Immunol Rev 2011 Nov; 244(1): 197-217, Yao, S. et al., Nat Rev Drug Disc 2013 Feb; 12(2): 130-146) и дополнительным сопутствующим нисходящим эффектам у CD137-положительной Т-клетки. В случае Т-клеток, активированных путем узнавания их соответствующих родственных мишеней, эффекты, вызванные путем костимуляции CD137, представляют собой дополнительную усиленную активацию, улучшенное выживание и повышенную пролиферацию, продуцирование провоспалительных цитокинов и улучшенную способность к уничтожению.

[0005] Преимущество костимуляции CD137 для устранения раковых клеток было

продемонстрировано в ряде доклинических in-vivo моделей. Форсированная экспрессия CD137L на клетках опухоли, например, приводит к отторжению опухоли (Melero, I. et al., Eur J Immunol 1998 Mar; 28(3): 1116-1121). Аналогичным образом форсированная экспрессия scFv к CD137 на клетках опухоли приводит к зависимому от CD4⁺ Т-клеток и NK-клеток устранению опухоли (Ye, Z. et al., Nat Med 2002 Apr; 8(4): 343-348, Zhang, H. et al., Mol Canc Ther 2006 Jan; 5(1): 149-155, Yang, Y. et al., Canc Res 2007 Mar 1; 67(5): 2339-2344). Также было продемонстрировано, что системно вводимое антитело к CD137 приводит к замедлению роста опухоли (Martinet, O. et al., Gene Ther 2002 Jun; 9(12): 786-792).

[0006] Было показано, что CD137 является превосходным маркером для встречающихся в природе реагирующих на опухоль Т-клеток в опухолях человека (Ye, Q. et al., Clin Canc Res: 2014 Jan 1; 20(1): 44-55), и что антитела к CD137 можно использовать для усиления распространения и активности инфильтрирующих меланому CD8⁺ лимфоцитов для применения в адаптивной Т-клеточной терапии (Chacon, J. A. et al., PloS One 2013 8(4): e60031).

[0007] Доклиническое обнаружение потенциального терапевтического преимущества костимуляции CD137 ускорило развитие терапевтических антител, целенаправленно воздействующих на CD137, BMS-663513 (Jure-Kunkel, M. et al., патент США 7288638) и PF-05082566 (Fisher, T. S. et al., Canc Immunol Immunother 2012 Oct; 61(10): 1721-1733); оба в настоящее время проходят ранние фазы клинических исследований.

[0008] Однако только недавно выяснилось, что двухвалентной связывающей CD137 молекулы, подобной антителу, самой по себе может быть недостаточно для образования скоплений CD137 на Т-клетках или NK-клетках и обеспечения эффективной активации, по аналогии с недостатком активности трехвалентного растворимого CD137L. В недавних публикациях, в которых использовали доклинические мышинные модели, были представлены in-vivo экспериментальные данные относительно того, что механизм действия других антител к TNFR фактически требует взаимодействия антитела через свою Fc-часть с Fc-гамма рецепторами на клетках, экспрессирующих Fc-гамма рецепторы (Bulliard, Y. et al., J Exp Med 2013 Aug 26; 210(9): 1685-1693, Bulliard, Y. et al., Immunol Cell Biol 2014 Jul; 92(6): 475-480). Вследствие этого механизм действия антител, находящихся в настоящее время на стадии клинических испытаний, может быть преобладающим за счет нецелевого образования скоплений через Fc-гамма рецепторы, которые могут практически произвольно зависеть от присутствия экспрессирующих Fc-γ клеток в окружающем пространстве опухоли.

[0009] Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в создании терапевтических средств, которые образуют скопления и активируют CD137 при помощи специфичного целенаправленно воздействующего на опухоль механизма действия.

[0010] Для удовлетворения этой неудовлетворенной потребности в настоящей заявке представлен новый подход одновременного связывания CD137 и опухолевого антигена HER2/neu посредством слитого полипептида со следующими свойствами:

- (a) со специфичностью связывания в отношении CD137 и
- (b) специфичностью связывания в отношении HER2/neu.

[0011] Этот слитый полипептид сконструирован для обеспечения зависящей от мишени-опухоли активации CD137 на лимфоцитах при помощи HER2, избыточно экспрессирующегося на опухолевых клетках. Ожидается, что такая молекула дополнительно активирует Т-клетки и/или NK-клетки, которые расположены в окружающем пространстве HER2-положительной опухоли. Такое биспецифическое средство может проявлять усиленные терапевтические эффекты по сравнению либо с

антителами к HER2, либо с антителами к CD137.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0012] В приведенном ниже перечне определены термины, фразы и сокращения, используемые по всему данному описанию. Предполагается, что все термины, перечисленные и определенные в данном документе, охватывают все грамматические формы.

[0013] Как используется в данном документе, если не указано иное, «CD137» означает CD137 человека. CD137 также известен как «4-1BB» или «представитель 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9)» или «индуцированный активацией лимфоцитов (ILA)». CD137 человека означает полноразмерный белок, обозначенный согласно UniProt как Q07011, его фрагмент или его вариант.

[0014] Как используется в данном документе, если не указано иное, «HER2» или «HER2/neu» означает HER2 человека. Her-2 или HER2/neu также известен как «erbB-2», «с-neu» или «p185». Her 2 человека означает полноразмерный белок, обозначенный согласно UniProt как P04626, его фрагмент или его вариант.

[0015] Как используется в данном документе, «выявляемая аффинность» означает способность связываться с выбранной мишенью с константой аффинности, составляющей, как правило, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М или меньше. Более низкие значения аффинности, как правило, уже не поддаются измерению с помощью стандартных способов, таких как ELISA, и, следовательно, имеют второстепенное значение.

[0016] Как используется в данном документе, «аффинность связывания» белка по настоящему раскрытию (например, мутеина липокалина) или его слитого полипептида с выбранной мишенью (в данном случае CD137 и/или HER2/neu), можно измерять (и тем самым определять значения KD для комплекса мутеин-лиганд) с помощью большого числа способов, известных специалисту в данной области. Такие способы включают без ограничения флуоресцентное титрование, конкурентный ELISA, калориметрические способы, такие как изотермическая титрационная калориметрия (ITC) и поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore). Такие способы хорошо известны из уровня техники и их примеры также подробно описаны ниже.

[0017] Следует также отметить, что на образование комплекса между соответствующей связывающей молекулой и ее лигандом оказывает влияние множество различных факторов, таких как концентрации соответствующих партнеров по связыванию, наличие конкурентов, показатель pH и ионная сила используемой буферной системы и экспериментальный способ, используемый для определения константы диссоциации, K_D (например, флуоресцентное титрование, конкурентный ELISA или поверхностный плазмонный резонанс, при этом упомянуты лишь некоторые из них), или даже математический алгоритм, который используют для оценки экспериментальных данных.

[0018] Следовательно, специалисту в данной области также очевидно, что значения K_D (константы диссоциации комплекса, образованного между соответствующей связывающей молекулой и ее мишенью/лигандом) могут варьироваться в пределах определенного экспериментального диапазона в зависимости от способа и экспериментальной установки, которую используют для определения аффинности конкретного мутеина липокалина в отношении данного лиганда. Это значит, что может иметь место незначительное отклонение в измеренных значениях K_D или в диапазоне допустимых значений, зависящее, например, от того, было ли значение K_D определено

при помощи поверхностного плазмонного резонанса (Biacore), конкурентного ELISA или «прямого ELISA».

[0019] Как используется в данном документе, «мутеин», «подвергнутый мутации» целостный объект (или белок, или нуклеиновая кислота) или «мутант» относится к обмену, делеции или вставке одного или более из нуклеотидов или аминокислот по сравнению со встречающимся в природе (дикого типа) «эталонным» остовом нуклеиновой кислоты или белка. Указанный термин также включает фрагменты мутеина и вариантов, описанных в данном документе. Мутеины липокалина по настоящему изобретению, их фрагменты или варианты предпочтительно сохраняют функцию связывания с CD137, описанным в данном документе.

[0020] Термин «фрагмент», используемый в данном документе применительно к мутеинам по настоящему раскрытию, относится к белкам или пептидам, полученным из полноразмерного зрелого липокалина слезы человека, который укорочен с N-конца и/или C-конца, т.е. у него отсутствует по меньшей мере одна из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут включать по меньшей мере 10 или более, как, например, 20 или 30 или более, последовательных аминокислот первичной последовательности зрелого липокалина и обычно поддаются выявлению в иммуноанализе зрелого липокалина. Как правило, термин «фрагмент», используемый в данном документе в отношении соответствующего белкового лиганда CD137 для мутеина липокалина по настоящему раскрытию, или для комбинации согласно настоящему раскрытию, или для белка слияния, описанного в данном документе, относится к укороченным с N-конца и/или C-конца белковым или пептидным лигандам, которые сохраняют способность полноразмерного лиганда быть распознанными и/или связанными мутеином согласно настоящему раскрытию.

[0021] Термин «мутагенез», используемый в данном документе, означает, что экспериментальные условия выбраны таким образом, что аминокислота, встречающаяся в природе в данном положении в последовательности зрелого липокалина, может быть заменена по меньшей мере одной аминокислотой, которая не присутствует в этом конкретном положении в соответствующей природной полипептидной последовательности. Термин «мутагенез» также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности путем делеции или вставки одной или более аминокислот. Таким образом, в пределах объема настоящего раскрытия находится то, что, например, одну аминокислоту в выбранном положении в последовательности заменяют отрезком из трех случайных мутаций, следствием чего является вставка двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента белка дикого типа. Такая вставка или делеция может быть введена независимо друг от друга в любой из сегментов пептидов, которые могут быть подвергнуты мутагенезу в настоящем раскрытии. Согласно одному иллюстративному варианту осуществления настоящего раскрытия вставка из нескольких мутаций может быть введена в петлю АВ остова выбранного липокалина (см. международную патентную заявку WO 2005/019256, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

[0022] Термин «случайный мутагенез» означает, что в конкретном положении в последовательности отсутствует предопределенная отдельная аминокислота (мутация), однако по меньшей мере две аминокислоты могут быть включены с определенной вероятностью в заранее определенное положение в последовательности в ходе мутагенеза.

[0023] «Идентичность» является свойством последовательностей, при помощи

которого определяют их сходство или родство. Термин «идентичность последовательностей» или «идентичность», используемый в настоящем раскрытии, означает процентную долю попарно идентичных остатков - последующее (гомологичное) выравнивание последовательности полипептида по настоящему раскрытию с последовательностью запроса - относительно количества остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей определяют путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество остатков и умножения полученного результата на 100.

[0024] Термин «гомология» используют в данном документе в его общепринятом значении, и он включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые рассматриваются как консервативные замены (например, обмен остатка глутамата на остаток аспартата) в аналогичных положениях в линейной аминокислотной последовательности полипептида по настоящему раскрытию (например, любого мутеина липокалина по настоящему раскрытию).

[0025] Процентную долю гомологии последовательностей или идентичности последовательностей, например, можно определять в данном документе с использованием программы BLASTP, версии blastp 2.2.5 (от 16 ноября 2002 года; см. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). Согласно данному варианту осуществления процентная доля гомологии основана на выравнивании целых полипептидных последовательностей (матрица: BLOSUM 62; штрафы за введения гэпа: 11.1; значение порога отсечения устанавливали как 10^{-3}), в том числе последовательностей пропептидов, предпочтительно с использованием остова белка дикого типа в качестве эталона в сравнительном анализе пар. Ее рассчитывают в виде процентной доли количеств «положительных» (гомологичных аминокислот), указанных в качестве итога в результате расчета с помощью программы BLASTP, разделенных на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

[0026] В частности, для того, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности липокалина (мутеина), отличного от липокалина дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, специалист в данной области может применять средства и способы, хорошо известные в данной области, например выравнивания либо вручную, либо с использованием компьютерных программ, таких как BLAST2.0, которая расшифровывается как средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любая другая подходящая программа, которая подходит для получения выравниваний последовательностей. Соответственно, липокалин дикого типа может служить в качестве «последовательности для сравнения» или «эталонной последовательности», тогда как аминокислотная последовательность липокалина, отличного от липокалина дикого типа, описанного в данном документе, служит в качестве «искомой последовательности». Термины «эталонная последовательность» и «последовательность дикого типа» используют в данном документе взаимозаменяемо. Предпочтительная последовательность липокалина дикого типа показана под SEQ ID NO: 18 (Tlc) или SEQ ID NO: 17 (NGAL) соответственно. В зависимости от того, является ли основой для мутеина липокалина по настоящему изобретению соответственно Tlc или NGAL, соответствующий липокалин дикого типа можно использовать в качестве эталонной последовательности или последовательности дикого типа.

[0027] «Гэпы» представляют собой пробелы в выравнивании, которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Таким образом, две копии точно

такой же последовательности характеризуются 100% идентичностью, но последовательности, которые в меньшей степени высоко консервативны и имеют делеции, добавления или замещения, могут характеризоваться меньшей степенью идентичности последовательностей. Специалисту в данной области будет понятно, что несколько компьютерных программ доступны для определения идентичности последовательностей с использованием стандартных параметров, например, Blast (Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) и Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197).

[0028] Термин «вариант», используемый в настоящем раскрытии, относится к производным белка или пептида, которые предусматривают модификации аминокислотной последовательности, например путем замены, делеции, вставки или химической модификации. Согласно некоторым вариантам осуществления такие модификации не снижают функциональность белка или пептида. Такие варианты включают белки, в которых одна или более аминокислот были замещены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от встречающихся в природе 20 аминокислот, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Однако такие замены также могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещают химически ему подобным аминокислотным остатком. Примеры консервативных замен представляют собой замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. Термин «вариант», используемый в данном документе в отношении соответствующего белкового лиганда CD137 для мутеина липокалина по настоящему раскрытию, или для комбинации согласно настоящему раскрытию, или для белка слияния, описанного в данном документе, относится к CD137 или его фрагменту соответственно, который имеет одну или более, как например: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или больше, аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с белком CD137 дикого типа соответственно, как, например, эталонным белком CD137, депонированным с идентификатором UniProt, описанным в данном документе. Вариант CD137, соответственно, предпочтительно характеризуется аминокислотной идентичностью, составляющей по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95%, с CD137 дикого типа человека, как, например, эталонным белком CD137, депонированным с идентификатором UniProt, описанным в данном документе.

[0029] Под «нативной последовательностью» липокалина подразумевают липокалин, который характеризуется такой же аминокислотной последовательностью, что и соответствующий полипептид, полученный из естественного окружения. Таким образом, нативная последовательность липокалина может характеризоваться аминокислотной последовательностью соответствующего встречающегося в природе липокалина из любого организма, в частности млекопитающего. Такая нативная последовательность полипептида может быть выделена из естественного окружения или может быть получена при помощи рекомбинантных способов или способов синтеза. Термин «нативная последовательность» полипептида, как правило, охватывает встречающиеся в природе усеченные или секретированные формы липокалина, встречающиеся в природе варианты формы, такие как в качестве альтернативы сплайсированные формы, и встречающиеся в природе аллельные варианты липокалина. «Вариант» полипептида означает биологически активный полипептид, характеризующийся по меньшей мере

приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида. Такие варианты включают, к примеру, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены или удалены на N- или C-конце полипептида. Как правило, вариант характеризуется по меньшей мере приблизительно 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, как, например, по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности, в том числе по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью аминокислотной последовательности или по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида. В качестве иллюстративного примера первые 4 N-концевых аминокислотных остатка (His-His-Leu-Leu) и последние 2 C-концевых аминокислотных остатка (Ser-Asp) могут быть удалены в мутеине липокалина слезы (Tlc) по настоящему раскрытию без воздействия на биологическую функцию белка, например SEQ ID NO: 32-38. Кроме того, в качестве другого иллюстративного примера определенные аминокислотные остатки могут быть удалены в мутеине липокалина 2 (NGAL) по настоящему раскрытию без воздействия на биологическую функцию белка, например (Lys-Asp-Pro, положения 46-48) относительно SEQ ID NO: 42.

[0030] Термин «положение» при использовании в соответствии с настоящим раскрытием означает либо положение аминокислоты в аминокислотной последовательности, описанной в данном документе, либо положение нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Для понимания термина «соответствует» или «соответствующий», используемого в данном документе в отношении положений в аминокислотной последовательности одного или более мутеинов липокалина, соответствующее положение определено не только номером предыдущих нуклеотидов/аминокислот. Следовательно, положение указанной аминокислоты в соответствии с настоящим раскрытием, которая может быть замещена, может варьироваться за счет делеции или добавления аминокислот в любом месте в (мутантном или дикого типа) липокалине. Подобным образом положение указанного нуклеотида в соответствии с настоящим раскрытием, который может быть замещен, может варьироваться за счет делеции или дополнительных нуклеотидов в любом месте в 5'-нетранслируемом участке (UTR) мутеина липокалина или липокалина дикого типа, в том числе в промоторе, и/или любых других регуляторных последовательностях или в гене (в том числе экзонах и интронах).

[0031] Таким образом, в отношении соответствующего положения в соответствии с настоящим раскрытием предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот могут отличаться по обозначенным номерам от подобных соседних нуклеотидов/аминокислот, но указанные соседние нуклеотиды/аминокислоты, которые могут быть обменены, удалены или добавлены, также предусматриваются в одном или более соответствующих положениях.

[0032] Кроме того, в отношении соответствующего положения в мутеине липокалина на основе эталонного остова в соответствии с настоящим раскрытием предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот являются структурно соответствующими положениям в любом месте в (мутантном или дикого типа) липокалине, даже если они могут отличаться по обозначенным номерам, что будет понятно специалисту в данной области, с учетом высококонсервативного общего паттерна фолдинга среди липокалинов.

[0033] Слово «выявлять», «выявление», «выявляемый» или «выявляющий»,

используемое в данном документе, понимается как на количественном, так и на качественном уровне, а также их комбинация. Таким образом, это включает количественные, полуколичественные и качественные измерения представляющей интерес молекулы.

5 [0034] «Субъект» представляет собой позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Термин «млекопитающее» используется в данном документе в отношении любого животного, классифицированного как млекопитающее, в том числе без ограничения людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных в зоопарках, для занятий спортом или животных-питомцев, как
10 например: овец, собак, лошадей, кошек, коров, крыс, свиней, высших приматов, таких как яванские макаки, и т.д., при этом упомянуты лишь некоторые иллюстративные примеры. Предпочтительно млекопитающим в данном документе является человек.

[0035] «Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для обеспечения полезных или необходимых результатов. Эффективное количество можно
15 вводить за одно или более введений.

[0036] «Образец» определяют как биологический образец, взятый у любого субъекта. Биологические образцы включают без ограничения кровь, сыворотку крови, мочу, экскременты, семенную жидкость или ткань.

[0037] «Субъединица» слитого полипептида, раскрытого в данном документе,
20 определяется как отрезок из аминокислот полипептида, при этом отрезок обозначает уникальную функциональную единицу указанного полипептида, как, например, предусматривает мотив связывания относительно мишени.

III. ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0038] На фигуре 1 представлен общий вид строения репрезентативных слитых
25 полипептидов, описанных в данной заявке, которые являются биспецифическими в отношении мишеней, HER2 и CD137. Репрезентативные слитые полипептиды были созданы на основе антитела, специфичного в отношении HER2 (SEQ ID NO: 3 и 4), и мутеина липокалина, специфичного в отношении CD137 (SEQ ID NO: 2).

Непосредственное слияние антитела с мутеином липокалина давало в результате слитый
30 полипептид с SEQ ID NO: 5 и 6. Мутеины липокалина подвергали слиянию с любым из четырех концов антитела с использованием каркаса сконструированного IgG4 с мутациями S228P, F234A и L235A (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14, SEQ ID NO: 15 и 16). Кроме того, в слитом полипептиде с SEQ ID NO: 7 и 8, производили мутацию, представляющую собой N297A, для удаления мотива
35 гликозилирования.

[0039] На фигуре 2 показаны результаты эксперимента с использованием ELISA, в котором определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов и
показательного антитела к HER2. Рекомбинантный HER2 наносили на микротитровальный планшет и тестируемые средства титровали, начиная с концентрации
40 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли при помощи антитела к Fc IgG человека, как описано в примере 2. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50 и наибольшим сигналом в качестве незадаанных параметров и наклоном, который фиксировали для единства. Полученные в результате значения EC50 представлены в таблице 2.

45 [0040] На фигуре 3 показаны результаты эксперимента с использованием ELISA, в котором определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов и положительного контроля, представляющего собой мутеин липокалина к CD137. Слитый CD137 человека с Fc наносили на микротитровальный планшет и тестируемые

средства титровали, начиная с концентрации 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли при помощи антитела к Fc IgG человека, как описано в примере 3. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50 и наибольшим сигналом в качестве незадаанных параметров и наклоном, который фиксировали для единства. Полученные в результате значения EC 50 представлены в таблице 3.

[0041] На фигуре 4 показаны результаты эксперимента с использованием ELISA, в котором определяли способность репрезентативных слитых полипептидов одновременно связывать обе мишени, HER2 и CD137. Рекомбинантный HER2 наносили на микротитровальный планшет с последующим титрованием слитых полипептидов, начиная с концентрации 100 нМ. Впоследствии добавляли одинаковую концентрацию биотинилированного CD137 человека-Fc, который выявляли при помощи экстравидина, как описано в примере 4.

[0042] На фигуре 5 показан результат анализа активации Т-клеток, в котором оценивали способность слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16 костимулировать ответы Т-клеток. Слитый полипептид с SEQ ID NO: 15 и 16 в разных концентрациях наносили на пластиковую чашку совместно с антителом к CD3 человека, а затем очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности. Уровни интерлейкина 2 (IL-2) в супернатанте измеряли, как описано в примере 5.

[0043] На фигуре 6 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали способность слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени-HER2 образом. В качестве контроля авторы настоящего изобретения использовали моноспецифическое связывающее HER2 антитело с SEQ ID NO: 3 и 4. В эксперименте антитело к CD3 человека наносили на пластиковую чашку для культивирования, а затем HER2-положительные клетки SKBR3 культивировали на чашке в течение ночи. На следующий день очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности в присутствии разных концентраций биспецифического слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 (закрашенные кружки) или контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4. Значения, определенные для SEQ ID NO: 3 и 4 при различных концентрациях, представлены в качестве средней величины (пунктирная линия). Уровни интерлейкина 2 (IL-2) (A) и IFN- γ (B) в супернатанте определяли при помощи анализа на основе электрохемилюминесценции. Эксперимент также проводили в присутствии избытка SEQ ID NO: 3 и 4 и измеряли уровни IL-2 (C) и IFN- γ (D) в супернатанте. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1.

[0044] На фигуре 7 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали способность слитого полипептида с SEQ ID NO: 11 и 12 костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени-HER2 образом. Для получения более подробной информации; см. пояснение к фигуре 6.

[0045] На фигуре 8 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали способность слитого полипептида с SEQ ID NO: 13 и 14 костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени-HER2 образом. Для получения более подробной информации; см. пояснение к фигуре 6.

[0046] На фигуре 9 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали способность слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16 костимулировать активацию Т-клеток зависимым от мишени-HER2 образом. Для получения более подробной информации; см. пояснение к фигуре 6.

[0047] На фигуре 10 представлен репрезентативный эксперимент на аффинность полипептидов к Fc γ RI, Fc γ RIII и FcRn, как описано в примерах 7 и 8.

[0048] На фигуре 11 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали

способность слитых полипептидов, указанных на фигуре, костимулировать активацию Т-клеток в различных клеточных линиях. Используемыми клеточными линиями были характерные HER2-положительные клетки (SKBR3, BT474) и клеточные линии, экспрессирующие HER2 на уровне, подобном таковому у здоровых клеток (HerG2, MCF7). В эксперименте антитело к CD3 человека наносили на пластиковую чашку для культивирования, а затем исследуемую клеточную линию культивировали на чашке в течение ночи. На следующий день очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности в течение трех дней в присутствии разных концентраций биспецифических слитых полипептидов, указанных ниже: (А) SEQ ID NO: 9 и 10 (непрерывные линии) или контрольное антитело с SEQ ID NO: 3 и 4 (прерывистая линия); (В) антитело к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33; (С) антитело к CD137 с SEQ ID NO: 34 и 35. Уровни интерлейкина 2 в супернатанте определяли при помощи анализа на основе электрохемилюминесценции. Нанесенный на график относительный ответ IL-2 соответствует соотношению ответов, полученных в присутствии и в отсутствии («фоновое значение») тестируемых продуктов.

[0049] На фигуре 12 представлены репрезентативные кривые, полученные в результате эксклюзионной хроматографии (SEC) биспецифических слитых полипептидов и контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 до (нижние кривые зависимости) и после (верхние кривые зависимости) инкубации в течение 4 недель при 40°C в PBS, pH 7,4. Концентрация образца составляла 20 мг/мл в каждом случае, обозначение слитых полипептидов были такими, как указанные на фигуре. Кривые зависимости, полученные в результате SEC, наносили на график с зубцом по оси у для лучшего представления.

[0050] На фигуре 13 представлен результат фармакокинетического анализа биспецифических слитых полипептидов и контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 на мышах. Самцам мышей линии CD-1 (3 мыши на момент времени) вводили внутривенно слитые полипептиды в дозе, составляющей 10 мг/кг. Уровни лекарственного средства выявляли при помощи ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней HER2 и CD137. Уровни трастузумаба в плазме крови определяли при помощи ELISA сэндвич-типа с мишенями HER2 и Fc человека. Данные приводили в соответствие с использованием двухкомпарментной модели.

[0051] На фигуре 14 представлен результат фармакокинетического анализа биспецифических слитых полипептидов и контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 на мышах. Самцы макаков-крабоедов, не подверженных воздействию трастузумаба, получали тестируемые продукты в виде внутривенного вливания продолжительностью, составляющей 60 минут, в дозе 3 мг/кг. Уровни лекарственного средства выявляли при помощи ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней HER2 и CD137. Уровни трастузумаба в плазме крови определяли при помощи ELISA сэндвич-типа с мишенями HER2 и Fc человека. Данные приводили в соответствие с использованием двухкомпарментной модели.

[0052] На фигуре 15 представлен результат *in vitro* оценки иммуногенности в отношении Т-клеток биспецифических слитых полипептидов, контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 и положительного контроля, представляющего собой гемоцианин лимфы улитки (KLH). Анализ проводили с использованием основанного на РВМС формата, который описан в примере 13, с 32 донорами и аллотипами антигена лейкоцитов человека (HLA), отражающими распределение в мировой популяции. (А) Индекс стимуляции (пролиферация в присутствии тестируемого продукта в сравнении с отсутствием тестируемого продукта). Средние ответы показаны в виде линий.

Пороговый уровень, который определяет отреагировавшего донора (индекс стимуляции >2), показан в виде пунктирной линии. (В) Количество респондеров.

[0053] Фигура 16. Относительный медианный объем опухоли после обработки при помощи биспецифических средств CD137/HER2 или контролей в гуманизированной мышинной модели опухоли. Мышам линии NSG s. с. прививали опухоли SK-OV-3, которым предоставляли возможность расти до размера, составляющего в среднем 120 мм³.

Мышей рандомизировали в группы обработки, и они получали 7×10⁶ свежих РВМС человека i. v., и данные для молекул и доз указывали в моменты времени через 1 час после введения РВМС в день 0 и снова в день 7 и день 14. В каждой группе было 10 мышей, за исключением группы, с использованием которой исследовали SEQ ID NO: 32 и 33, в которой было 7 мышей. Рост опухоли регистрировали каждые 3-4 дня.

[0054] На фигуре 17 представлен репрезентативный эксперимент, в котором изучали способность слитых полипептидов, указанных на фигуре, активировать путь, связанный с CD137, в зависимости от целевых клеток линии NCI-N87 с высоким уровнем экспрессии HER2. В эксперименте опухолевые целевые клетки линии NCI-N87 культивировали на чашках в течение ночи. На следующий день репортерные клетки NF-κB-luc2P/4-1BB Jurkat добавляли к нанесенным целевым клеткам в присутствии разных концентраций биспецифических слитых полипептидов, указанных ниже: (А) SEQ ID NO: 9 и 10 (непрерывные линии) или контрольное антитело с SEQ ID NO: 3 и 4 (прерывистая линия); (В) антитело к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33; (С) антитело к CD137 с SEQ ID NO: 34 и 35. По люминесцентному сигналу (RLU) определяли относительное измерение активации пути, связанного с CD137. Проводили анализ логистической кривой с четырьмя параметрами при помощи программного обеспечения GraphPad Prism.

[0055] На фигуре 18 (А) показан медианный объем опухоли после обработки при помощи биспецифических средств CD137/HER2 или контролей в гуманизированной мышинной модели опухоли. Мышам линии NOG s. с. прививали опухоли SK-OV-3, которым предоставляли возможность расти до размера, составляющего в среднем 120 мм³. Мышей рандомизировали в группы обработки, и они получали 7×10⁶ свежих РВМС человека i. v., и данные для молекул и доз указывали на моменты времени через 1 час после введения РВМС в день 0 и снова в день 7 и день 14. В каждой группе было 10 мышей. Рост опухоли регистрировали два раза в неделю в течение 20 дней. (В) показаны результаты иммуногистохимического анализа маркера лимфоцитов человека, CD45, в качестве маркера инфильтрации Т-клетками человека опухолей от двух мышей, которые отбирали в день 20 после обработки.

[0056] На фигуре 19 (А) показан CD45-, CD3- и CD8-фенотип РМВС групп обработок и контролей из примера 16, полученный в день 19 того исследования. На фигуре 19А слева показана процентная доля всех РМВС, экспрессирующих CD45 человека, тогда как на фигуре 19А справа показана процентная доля экспрессирующих CD45 РМВС, которые также экспрессируют CD3 и CD8. На фигуре показано усиленное распространение CD8⁺ эффекторных Т-клеток человека в группе обработки с использованием mAb к CD137. (В) Показан уровень летальности в группах обработок и контролей из примера 16. Нанесенные на график значения фигуры 19В соответствуют количеству мышей на группу из десяти особей, которые умерли сами или нуждаются в умерщвлении, исходя из установленных общих критериев состояния.

[0057] Фигура 20. Летальность в группах обработок и контролей из примера 18. Нанесенные на график значения соответствуют количеству мышей на группу из десяти особей (SEQ ID NO: 9 и 10, 4 мкг: группа из девяти особей), которые умерли сами или

нуждаются в умерщвлении, исходя из установленных общих критериев состояния.

[0058] Фигура 21. Относительный медианный объем опухоли после обработки при помощи биспецифических средств CD137/HER2 или контролей в гуманизированной мышинной модели опухоли. Мышам линии NSG s. c. прививали опухоли SK-OV-3,

которым давали возможность расти до размера составляющего в среднем 110 мм³.

Мышей рандомизировали в группы обработки, и они получали 7×10⁶ свежих РВМС человека во внутривенных и внутрибрюшинных инъекциях молекул и доз, указанных в моменты времени через 1 час после введения РВМС в день 0 и снова в день 7 и день 14. В каждой группе было 10 мышей, за исключением 7 группы (SEQ ID NO: 9 и 10, 4 мкг), в которой было только 9 мышей. Рост опухоли регистрировали каждые 3-4 дня.

[0059] Фигура 22. Иммуногистохимический анализ CD45-положительных лимфоцитов человека. Опухоли, которые удаляли оперативным путем у несущих опухоли мышей и в пределах шести опухолей от каждой группы, фиксировали с помощью формалина, заливали парафином и подвергали иммуногистохимическому анализу с использованием антител к CD45 человека. CD45-положительные клетки идентифицировали путем окрашивания 3,3'-диаминобензидином (DAB). Для обеспечения отчетливого представления степени DAB-позитивности на изображении с градацией серого, контраст и яркость изображений корректировали в цифровой форме.

[0060] На фигуре 23 Цифровая количественная оценка степени DAB-позитивности на изображениях, показанных на фигуре 22. На фигуре показана повышенная частота встречаемости hCD45-положительных лимфоцитов человека в группе, обрабатываемой при помощи SEQ ID NO: 9 и 10, по сравнению с разными контролями (см. пример 17 для получения более подробной информации).

[0061] Фигура 24. Фенотип РМВС групп обработок и контролей из примера 18, полученный в день (19) того исследования. (А) Процентная доля всех РМВС, экспрессирующих CD45 человека. (В) Процентная доля экспрессирующих CD45 РМВС, которые экспрессируют CD8. На фигуре показано усиленное распространение CD8⁺ эффекторных Т-клеток человека в группе обработки с использованием mAb к CD137 (SEQ ID NO: 32 и 33) по сравнению с отрицательными контролями и группами обработки с использованием SEQ ID NO: 9 и 10.

IV. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТИЯ

[0062] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид содержит по меньшей мере две субъединицы в любом порядке: первую субъединицу, которая предусматривает полноразмерный иммуноглобулин или его антиген-связывающий домен, специфичный в отношении HER2/neu, и вторую субъединицу, которая предусматривает мутеин липокалина, специфичный в отношении CD137.

[0063] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид также может содержать третью субъединицу. К примеру, полипептид может содержать субъединицу, специфичную в отношении CD137. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная третья субъединица предусматривает мутеин липокалина, специфичный в отношении CD137.

[0064] Согласно некоторым вариантам осуществления одна субъединица может быть присоединена к другой субъединице, как, по сути, показано на фигуре 1. Например, один мутеин липокалина может быть присоединен посредством пептидной связи к С-концу домена тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, N-концу VH, С-концу легкой цепи (VL) иммуноглобулина и/или N-концу VL (см. фигуру 1). Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления субъединица, представляющая собой мутеин

липокалина, может быть слита на своем N-конце и/или своем С-конце с субъединицей, представляющей собой иммуноглобулин. Например, мутеин липокалина может быть присоединен посредством пептидной связи между С-концом константного участка тяжелой цепи (CH) или С-концом константного участка легкой цепи (CL)

5 иммуноглобулина. Согласно еще некоторым дополнительным вариантам осуществления пептидная связь может представлять собой неструктурированный линкер (G4S)₃, например, который показан под SEQ ID NO: 19.

[0065] В связи с этим одна субъединица может быть слита на своем N-конце и/или своем С-конце с другой субъединицей. Например, в тех случаях, когда одна субъединица 10 предусматривает полноразмерный иммуноглобулин, другая субъединица может быть присоединена посредством пептидной связи между N-концом второй субъединицы и С-концом константного участка тяжелой цепи (CH) указанного иммуноглобулина. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления третья субъединица может быть присоединена посредством пептидной связи между N-концом третьего 15 связывающего домена и С-концом константного участка легкой цепи (CL) указанного иммуноглобулина. Согласно еще некоторым дополнительным вариантам осуществления пептидная связь может представлять собой неструктурированный линкер (G4S)₃, например, который показан под SEQ ID NO: 19.

[0066] Согласно некоторым вариантам осуществления относительно слитого 20 полипептида по настоящему раскрытию, одна из субъединиц которого предусматривает полноразмерный иммуноглобулин, в то время как полипептид одновременно связывает HER2/neu и CD137, одновременно может быть сохранена Fc-функция Fc-участка полноразмерного иммуноглобулина в отношении положительной по Fc-рецептору клетки.

25 [0067] Согласно некоторым вариантам осуществления CD137-специфичная субъединица, включенная в слитый полипептид по настоящему раскрытию, может представлять собой мутеин липокалина, который специфичен в отношении CD137, такой как мутеин липокалина с SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления CD137-специфичная субъединица, включенная в слитый полипептид по 30 настоящему раскрытию, может представлять собой полноразмерный иммуноглобулин или его антиген-связывающий домен, который специфичен в отношении CD137, такой как моноклональное антитело (например, антитело с SEQ ID NO: 3 и 4).

[0068] Согласно некоторым вариантам осуществления HER2/neu-специфичная субъединица, включенная в слитый полипептид по настоящему раскрытию, может 35 представлять собой мутеин липокалина, который специфичен в отношении HER2/neu. Согласно некоторым вариантам осуществления HER2/neu-специфичная субъединица, включенная в слитый полипептид по настоящему раскрытию, может представлять собой полноразмерный иммуноглобулин или его антиген-связывающий домен, который специфичен в отношении HER2/neu.

40 [0069] Согласно некоторым вариантам осуществления в слитом полипептиде по настоящему раскрытию CD137-специфичная субъединица слита с HER2/neu-специфичной субъединицей.

[0070] Согласно некоторым дополнительным определенным вариантам осуществления HER2/neu-специфичная субъединица предусматривает полноразмерный 45 иммуноглобулин (такой как моноклональное антитело) или его антиген-связывающий домен, а CD137-специфичная субъединица предусматривает мутеин липокалина. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид предусматривает аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:

5 и 6, 7 и 8, 9 и 10, 11 и 12, 13 и 14 или 15 и 16.

[0071] Согласно некоторым другим вариантам осуществления относительно слитого полипептида по настоящему раскрытию, одна из субъединиц которого предусматривает полноразмерный иммуноглобулин, в то время как полипептид одновременно связывает HER2/neu и CD137, Fc-функцию Fc-участка полноразмерного иммуноглобулина в отношении положительной по Fc-рецептору клетки можно ослаблять или полностью подавлять при помощи белковой инженерии. Этого можно добиться, например, путем смены каркаса IgG1 на IgG4, поскольку, как известно, IgG4 проявляет ослабленные свойства взаимодействия в отношении Fc-гамма рецептора по сравнению с IgG1. Для того, чтобы дополнительно ослабить остаточное связывание с Fc-гамма рецепторами, в каркас IgG4 можно вводить мутации, такие как F234A и L235A. Кроме того, для сведения к минимуму обмена в половине антитела IgG4 в каркас IgG4 можно вводить мутацию S228P. Согласно еще некоторым дополнительным вариантам осуществления дополнительная мутация N297A может присутствовать в тяжелой цепи иммуноглобулина слитого полипептида с целью удаления природного мотива гликозилирования; в примере 7 представлено доказательство того, что модификация подкласса изотипа или конструирование изотипа приводит к потере функции связывания с Fc-рецептором.

[0072] Согласно некоторым другим вариантам осуществления относительно слитого полипептида по настоящему раскрытию, одна из субъединиц которого предусматривает полноразмерный иммуноглобулин, в то время как полипептид одновременно связывает HER2/neu и CD137, Fc-функция Fc-участка полноразмерного иммуноглобулина в отношении положительных по неонатальному Fc-рецептору (FcRn) клеток сохраняется, хотя Fc-участок может быть модифицирован, например путем смены изотипа или подкласса изотипа или путем конструирования, например путем конструирования изотипа, как описано в данном документе. В примере 8 представлено доказательство того, что Fc-модифицированные или Fc-сконструированные Fc-участки слитого полипептида по настоящему раскрытию сохраняют функцию связывания с FcRn.

[0073] Согласно некоторым вариантам осуществления в результате одновременного связывания с HER2 на опухолевых клетках и CD137 на поверхности эффекторных клеток иммунной системы, таких как Т-клетки или НК-клетки, слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут проявлять зависимую от HER2 активацию эффекторных клеток, тем самым эффекторная клетка иммунной системы активно лизует экспрессирующую HER2 опухолевую клетку.

[0074] Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления слитый полипептид способен проявлять сопоставимый или более высокий уровень зависимой от HER2 активации CD137, как и иммуноглобулин, включенный в такой слитый полипептид, например, при измерении в анализе, в котором показано зависимое от мишени распространение инфильтрирующих опухоль лимфоцитов ex-vivo, по сути, описанном в Chacon, J. A. et al., PloS one 2013 8(4): e60031. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления слитый полипептид способен проявлять сопоставимый или более высокий уровень зависимой от HER2 активации CD137, как и иммуноглобулин, включенный в такой слитый полипептид, например, при измерении в in-vivo полученной при помощи ксенотрансплантата модели рака молочной железы человека, по сути, описанной в Kohrt, H. et al, J Clin Invest. 2012 Mar; 122(3): 1066-75.

[0075] Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-часть иммуноглобулина, включенного в слитый полипептид по настоящему раскрытию, может способствовать поддержанию уровней слитого полипептида в сыворотке крови, имеющих решающее значение для его стабильности и нахождения в организме. Например, в тех случаях,

когда Fc-часть связывается с Fc-рецепторами на эндотелиальных клетках и на фагоцитах, слитый полипептид может становиться интернализированным и возвращаться обратно в кровоток, что увеличивает время его полужизни в организме.

5 [0076] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид по настоящему раскрытию может быть способным связывать CD137 со значением EC50 по меньшей мере таким же как или превосходящим значение EC50 для мутеина липокалина, специфичного в отношении CD137, который включен в такой слитый полипептид, такого как мутеины липокалина с SEQ ID NO: 2, например, при оценке указанного мутеина липокалина и полипептида в анализе ELISA, по сути, описанном
10 в примере 3.

[0077] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид может быть способен связывать CD137 со значением EC50, составляющим по меньшей мере приблизительно 1 нМ или даже меньше, как например: приблизительно 0,6 нМ, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,4 нМ или приблизительно 0,3 нМ, например,
15 при оценке полипептида в анализе ELISA, по сути, описанном в примере 3.

[0078] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид по настоящему раскрытию может быть способен связывать HER2/neu со значением EC50, сопоставимым со значением EC50 для иммуноглобулина, специфичного в отношении HER2/neu, который включен в такой слитый полипептид, такого как антитело с тяжелой
20 и легкой цепями, представленными под SEQ ID NO: 3 и 4, например, при оценке указанного иммуноглобулина и слитого полипептида в анализе ELISA, по сути, описанном в примере 2.

[0079] Согласно другому аспекту слитый полипептид может быть способен связывать HER2/neu с его лигандом со значением EC50, составляющим по меньшей мере
25 приблизительно 1 нМ или даже меньше, как например: приблизительно 0,4 нМ, приблизительно 0,3 нМ или приблизительно 0,2 нМ, например, при оценке полипептида в анализе ELISA, по сути, описанном в примере 2.

[0080] Согласно некоторым вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию, специфичные в отношении как CD137, так и HER2/neu, могут
30 быть способны к одновременному связыванию CD137 и HER2/neu, например, при оценке указанного слитого полипептида в анализе ELISA, по сути, описанном в примере 4.

[0081] Согласно некоторым вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут быть способны костимулировать ответы Т-клеток в функциональном анализе активация Т-клеток, по сути, описанном в примере 5. Согласно
35 некоторым вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут быть способны индуцировать секрецию IL-2 и/или IFN-гамма и Т-клеточную пролиферацию в функциональном анализе активации Т-клеток, по сути, описанном в примере 5. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут приводить к успешной активации Т-
40 клеток в функциональном анализе активации Т-клеток, по сути, описанном в примере 5. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут обеспечивать локальную индукцию продуцирования IL-2 и/или IFN-гамма Т-клетками в окружающем пространстве HER2/neu-положительных опухолевых клеток, как, по сути, описано в примере 6. «В окружающем пространстве
45 HER2/neu-положительных клеток», при использовании в данном документе, означает расстояние между связанной Т-клеткой и HER2/neu-положительной опухолевой клеткой, которые обе связаны, т.е. «соединены» одним и тем же слитым полипептидом по настоящему раскрытию.

А. Примерные иммуноглобулины, которые включены в слитые полипептиды [0082] Согласно некоторым вариантам осуществления относительно слитого

полипептида первый связывающий домен предусматривает полноразмерный иммуноглобулин или его антиген-связывающий домен, специфичный в отношении

5 HER2/neu. Иммуноглобулин, например, может представлять собой IgG1 или IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуноглобулин представляет собой моноклональное антитело к HER2/neu. Несколько иллюстративных примеров для таких иммуноглобулинов включают: трастузумаб (торговые названия Герклон, Герцептин) и пертузумаб (также называемый 2C4, торговое название Перджета).

10 В. Иллюстративные мутеины липокалина, которые включены в слитые полипептиды [0083] Как используется в данном документе, «липокалин» определяется как

мономерный белок весом примерно 18-20 кДа, имеющий участок с супервторичной структурой, представляющей собой цилиндрический β -складчатый лист, содержащий

15 петель (предпочтительно четыре) на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Именно разнообразие петель в остальной части жесткого остова липокалина приводит к появлению разнообразия различных видов связывания среди представителей семейства липокалинов, при этом каждый способен приспосабливаться

к мишеням различных размера, формы и с различными химическими особенностями (рассмотрены, например, в Flower, D.R. (1996), ранее; Flower, D.R. et al. (2000), ранее,

20 или Skerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350). В действительности липокалиновое семейство белков естественным образом развивалось для связывания широкого спектра лигандов, при этом они характеризуются необычайно низкими

25 идентичностями последовательностей менее 20%), по-прежнему сохраняя высококонсервативный общий паттерн фолдинга. Соответствие между положениями в разных липокалинах хорошо известно специалисту в данной области. См., например, патент США №7250297.

[0084] Как отмечалось выше, липокалин представляет собой полипептид,

30 определяемый его супервторичной структурой, а именно участком с супервторичной структурой, представляющей собой цилиндрический β -складчатый лист, содержащим восемь β -нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Настоящее раскрытие не ограничено мутеинами

35 липокалина, конкретно раскрытыми в данном документе. В этом отношении настоящее раскрытие относится к мутеину липокалина с участком с супервторичной структурой, представляющей собой цилиндрический β -складчатый лист, содержащим восемь β -

нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания, где по меньшей мере одна аминокислота из каждой по

40 указанный липокалин является эффективным в связывании CD137 с выявляемой аффинностью.

[0085] Согласно одному конкретному варианту осуществления мутеин липокалина, раскрытый в данном документе, представляет собой мутеин липокалина слезы (TLPC или Tlc) человека, также называемый липокалином-1, преальбумином слезы или белком

45 железы фон Эбнера. Термин «липокалин слезы человека», или «Tlc», или «липокалин-1», как используется в данном документе, относится к зрелому липокалину слезы человека с номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P31025 (изоформа 1).

Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных

SWISS-PROT/UniProt P31025, можно использовать в качестве предпочтительной «эталонной последовательности», более предпочтительно аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 18, используют в качестве эталонной последовательности.

5 [0086] Согласно другому конкретному варианту осуществления мутеин липокалина, раскрытый в данном документе, представляет собой мутеин липокалина 2 человека. Термин «липокалин 2 человека», или «Lcn 2 человека», или «NGAL человека», используемый в данном документе, относится к зрелому человеческому липокалину, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов (NGAL), с номером доступа в базе
10 данных SWISS-PROT/UniProt P80188. Мутеин липокалина 2 человека по настоящему раскрытию также можно назвать в данном документе «мутеином hNGAL». Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, можно использовать в качестве предпочтительной «эталонной последовательности», более предпочтительно аминокислотную
15 последовательность, показанную под SEQ ID NO: 17, используют в качестве эталонной последовательности.

[0087] Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин липокалина, связывающий CD137 с выявляемой аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина другой аминокислотой,
20 например остатком серина. Согласно некоторым другим вариантам осуществления мутеин липокалина, связывающий CD137 с выявляемой аффинностью, может включать один или более ненативных остатков цистеина, замещающих одну или более аминокислот липокалина дикого типа. Согласно дополнительному конкретному варианту осуществления мутеин липокалина согласно настоящему раскрытию включает по
25 меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты остатком цистеина с образованием тем самым одного или более цистеиновых мостиков. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере два участка петли. Определение этих участков используют в данном документе в соответствии с Flower (Flower, 1996, ранее, Flower, et al., 2000, ранее) и
30 Breustedt et al. (2005, ранее). В родственном варианте осуществления в раскрытии сообщается об одном или более мутеинах липокалина, которые способны к активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, путем связывания с CD137.

[0088] Белки по настоящему раскрытию, которые направлены против или специфичны в отношении CD137, включают любое количество мутеинов-белков со специфическим
35 связыванием, в которых за основу взят остов определенного белка. Предпочтительно количество нуклеотидов или аминокислот соответственно, которое обменивают, удаляют или вставляют, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, как например: 25, 30, 35, 40, 45 или 50, при этом предпочтительными являются 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11, и даже более предпочтительными являются 9,
40 10 или 11. Однако предпочтительно, чтобы мутеин липокалина по настоящему раскрытию по-прежнему был способен к связыванию CD137.

[0089] Согласно одному аспекту настоящее раскрытие включает разные мутеины липокалина, которые связывают CD137 по меньшей мере с выявляемой аффинностью. В этом смысле CD137 может быть рассмотрен как отличный от естественного лиганд
45 эталонного липокалина дикого типа, где «отличный от естественного лиганд» относится к соединению, которое не связывается с липокалинами дикого типа в физиологических условиях. Путем внесения в липокалины дикого типа одной или более мутаций в определенные положения в последовательности авторы настоящего изобретения

показали, что возможны высокая аффинность и высокая специфичность в отношении CD137, лиганда, отличного от естественного. Согласно некоторым вариантам осуществления в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже большем количестве нуклеотидных триплетов, кодирующих определенные положения в последовательности в липокалинах дикого типа, случайный мутагенез можно выполнять посредством замены в этих положениях подмножеством нуклеотидных триплетов.

[0090] К тому же мутеины липокалина по настоящему раскрытию могут иметь подвергнутый мутации аминокислотный остаток в любом одном или более, в том числе по меньшей мере в любом одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати, из положений в последовательности, соответствующих определенным положениям последовательности в линейной полипептидной последовательности эталонного липокалина.

[0091] Белок по настоящему раскрытию может включать дикого типа (природную) аминокислотную последовательность «исходного» остова белка (такого как липокалин) вне подвергнутых мутации положений в аминокислотной последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин липокалина согласно настоящему раскрытию также может нести одну или более аминокислотных мутаций в положении/положениях в последовательности, если только такая мутация, по меньшей мере в значительной степени, не препятствует связывающей активности и фолдингу мутеина или не нарушает их. Такие мутации могут быть выполнены очень легко на уровне ДНК с использованием разработанных стандартных способов (Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Иллюстративные примеры перестроек аминокислотной последовательности представляют собой вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности в отношении полярности, а также размера. Примеры консервативных замен представляют собой замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, существует также возможность введения неконсервативных перестроек в аминокислотную последовательность. К тому же вместо замещения отдельных аминокислотных остатков существует также возможность либо вставлять, либо подвергать делеции одну или более последовательных аминокислот первичной структуры липокалина слезы человека, если только эти делеции или вставка приводят в результате к стабильно свернутому/функциональному мутеину (например, мутеинам T1c с усеченными N- и C-концами). В таком мутеине, к примеру, один или более аминокислотных остатков добавлены или подвергнуты делеции на N- или C-конце полипептида. В целом такой мутеин может характеризоваться приблизительно по меньшей мере 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, а именно по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина слезы человека. В качестве иллюстративного примера настоящее раскрытие также охватывает мутеины T1c, определенные выше, в которых первые четыре N-концевых аминокислотных остатка последовательности зрелого липокалина слезы человека (His-His-Leu-Leu; положения 1-4) и/или последние два C-концевых аминокислотных остатка (Ser-Asp; положения 157-158) линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека были подвергнуты делеции (SEQ ID NO: 32-38). Кроме того, в качестве другого

иллюстративного примера настоящее раскрытие также охватывает мутеины NGAL, определенные выше, в которых были подвергнуты делеции аминокислотные остатки (Lys-Asp-Pro, положения 46-48) линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина 2 человека (hNGAL) (SEQ ID NO: 42).

- 5 [0092] Аминокислотная последовательность мутеина липокалина, раскрытого в данном документе, характеризуется высокой идентичностью последовательности с эталонным липокалином по сравнению с идентичностями последовательностей с другими липокалинами. В этом общем смысле аминокислотная последовательность мутеина липокалина по настоящему раскрытию по меньшей мере в значительной
- 10 степени подобна аминокислотной последовательности эталонного липокалина, при условии, что в ней возможны гэпы (как определено ниже) при выравнивании, которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина липокалина по настоящему раскрытию, которая в значительной степени подобна последовательностям эталонного липокалина, согласно
- 15 некоторым вариантам осуществления характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 75% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 80% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 82% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 85%
- 20 идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 87% идентичностью или гомологией последовательности или по меньшей мере 90% идентичностью или гомологией последовательности, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью или гомологией последовательности с последовательностью эталонного липокалина, при условии, что сохраняются измененные положение или
- 25 последовательность и что возможны один или более гэпов.

- [0093] Как используется в данном документе, мутеин липокалина по настоящему раскрытию «специфически связывает» мишень (например, CD137), если он способен отличать ту мишень от одной или более эталонных мишеней, поскольку специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. «Специфичное
- 30 связывание» можно определять, например, согласно результатам вестерн-блоттингов, анализов ELISA, RIA, ECL, IRMA, с использованием FACS, ИНС и пептидных сканирований.

- [0094] Согласно одному варианту осуществления мутеины липокалина по настоящему раскрытию слиты на своем N-конце и/или своем C-конце с партнером по слиянию,
- 35 который представляет собой белковый домен, который удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови. Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления белковый домен представляет собой Fc-часть иммуноглобулина, домен СН3 иммуноглобулина, домен СН4 иммуноглобулина, альбумин-связывающий пептид или альбумин-связывающий белок.

- 40 [0095] Согласно другому варианту осуществления мутеины липокалина по настоящему раскрытию конъюгированы с соединением, которое удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови. Более предпочтительно мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроксиэтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, домена СН3 иммуноглобулина,
- 45 домена СН4 иммуноглобулина, альбумин-связывающего пептида и альбумин-связывающего белка.

[0096] Согласно еще одному варианту осуществления настоящее раскрытие относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность,

кодирующую мутеин липокалина, раскрытый в данном документе. Настоящее раскрытие охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

[0097] Согласно одному аспекту настоящее раскрытие предусматривает мутеины липокалина человека, которые связывают CD137, и их полезные пути применения.

5 Настоящее раскрытие также предусматривает способы получения связывающих CD137 белков, описанных в данном документе, а также композиций, содержащих такие белки. Связывающие CD137 белки по настоящему раскрытию, а также их композиции можно применять в способах выявления CD137 в образцах или в способах связывания CD137 в субъекте. Ранее не были описаны такие мутеины липокалина человека с такими
10 качествами, сопутствующими путям применения, предусмотренным настоящим раскрытием.

1. Иллюстративные мутеины липокалина, специфичные в отношении CD137

[0098] Согласно одному аспекту настоящее раскрытие предусматривает связывающие CD137 мутеины липокалина слезы человека.

15 [0099] В связи с этим настоящее раскрытие предусматривает один или более мутеинов T1c, которые способны к связыванию CD137 с аффинностью, измеренной по KD, составляющей приблизительно 300 нМ или ниже и даже приблизительно 100 нМ или ниже.

[00100] Согласно некоторым вариантам осуществления такой мутеин T1c содержит
20 подвергнутый мутации аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека (SEQ ID NO: 18).

[00101] Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления такой мутеин
25 T1c может содержать подвергнутый мутации аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 и 108 в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека.

[00102] Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления такой мутеин T1c может дополнительно включать подвергнутый мутации аминокислотный
30 остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 101, 111, 114 и 153 в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека.

[00103] Согласно другим конкретным вариантам осуществления T1c может содержать подвергнутый мутации аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101,
35 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека.

[00104] Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления мутеин T1c может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или даже больше подвергнутых мутации аминокислотных
40 остатков в одном или более положениях в последовательности, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 последовательности в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека, и где указанный полипептид связывает CD137, в частности CD137 человека.

45 [00105] Согласно еще некоторым дополнительным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид представляет собой мутеин T1c, по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого липокалина слезы человека, содержащий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12 или даже больше подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях 526-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 и 108 в последовательности, и где указанный полипептид связывает CD137, в частности CD137 человека.

[00106] Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин липокалина согласно настоящему раскрытию может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина, например, остатком серина. Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин T1c согласно настоящему раскрытию включает аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положениях 61 и/или 153 другой аминокислотой, такой как остаток серина. В данном случае отмечается, что было обнаружено, что удаление дисульфидной связи в структуре (на уровне соответствующей библиотеки не подвергнутых мутации нуклеиновых кислот) липокалина дикого типа слезы, которая образована остатками цистеина 61 и 153 (см. Breustedt, et al., 2005, ранее), может обеспечить мутеины липокалина слезы, которые не только стабильно сворачиваются, но и также способны связывать указанный отличный от естественного лиганд с высокой аффинностью. Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления мутеин T1c согласно настоящему раскрытию включает аминокислотные замены Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro или Trp и Cys 153 → Ser или Ala. Как было доказано, такая замена удобна для предупреждения образования встречающегося в природе дисульфидного мостика, соединяющего Cys 61 и Cys 153, и облегчения тем самым манипуляции с мутеином. Однако мутеины липокалина слезы, которые связывают CD137 и имеют дисульфидный мостик, образованный между Cys 61 и Cys 153, также являются частью настоящего раскрытия.

[00107] Согласно некоторым вариантам осуществления устранение дисульфидной связи в структуре может обеспечивать дополнительное преимущество предоставления возможности (самопроизвольного) образования или преднамеренного введения отличных от естественных искусственных дисульфидных связей в мутеины по настоящему раскрытию, повышая тем самым стабильность мутеинов. Например, согласно некоторым вариантам осуществления или два, или все три из кодонов цистеина в положениях 61, 101 и 153 заменены кодоном другой аминокислоты. Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления мутеин T1c согласно настоящему раскрытию включает аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положении 101 остатком серина или остатком гистидина.

[00108] Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин согласно настоящему раскрытию включает аминокислотную замену нативной аминокислоты остатком цистеина в положениях 28 или 105 в отношении аминокислотной последовательности зрелого липокалина слезы человека.

[00109] Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления мутеин согласно настоящему раскрытию включает аминокислотную замену нативного остатка аргинина в положении 111 остатком пролина. Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления мутеин согласно настоящему раскрытию включает аминокислотную замену нативного остатка лизина в положении 114 остатком триптофана или глутаминовой кислотой.

[00110] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий CD137 мутеин T1c согласно настоящему раскрытию включает в одном или более положениях, соответствующих положениям 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 в линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезы человека (SEQ ID NO: 18), один или

более из следующих подвергнутых мутации аминокислотных остатков: Ala 5 → Val или Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg или Asn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Arg или Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile и Cys 153 → Ser. Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин Tlc согласно настоящему раскрытию включает два или более, а именно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, более того, как например: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или все подвергнутые мутации аминокислотные остатки в этих положениях в последовательности зрелого липокалина слезы человека.

[00111] Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления связывающий CD137 мутеин Tlc включает один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого липокалина слезы человека:

1. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
2. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
3. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser;
4. Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
5. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
6. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro или
7. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro.

[00112] В остальном участке, т.е. участке, отличающемся от положений 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 и 153 в последовательности, мутеин T1c по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) вне подвергнутых

5 мутации положений в аминокислотной последовательности.
[00113] В еще дополнительных вариантах осуществления мутеин T1c согласно настоящему раскрытию характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью последовательности или по меньшей мере 70% гомологией последовательности с последовательностью зрелого липокалина слезы человека (SEQ ID NO: 18).

10 [00114] Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления мутеин T1c по настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 32-38, или ее фрагмент или вариант.

[00115] Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления мутеин T1c по настоящему раскрытию характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более высокой идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-38.

[00116] Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина T1c с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-38, структурные гомологи которой характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательностей, составляющей более чем приблизительно 60%, предпочтительно более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% относительно указанного мутеина T1c.

25 [00117] Мутеин T1c согласно настоящему раскрытию можно получать с помощью мутагенеза встречающейся в природе формы липокалина слезы человека. Согласно некоторым вариантам осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из приведенных ниже иллюстративных
30 замен, предусматривается в том случае, если только мутеин липокалина сохраняет свою способность связываться с CD137, и/или он характеризуется идентичностью последовательности с последовательностью, впоследствии содержащей замену, в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, а именно по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%
35 или большая идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина слезы человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT - P31025).

[00118] Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления настоящее раскрытие предусматривает мутеин T1c, который связывает CD137 с аффинностью, измеренной по KD, составляющей приблизительно 200 нМ или ниже.

40 [00119] Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления мутеин T1c по настоящему раскрытию не нарушает связывание CD137L с CD137.

[00120] Согласно другому аспекту настоящее раскрытие относится к новым мутеинам липокалина 2 человека (Lcn2 человека или hNGAL) со специфичностью связывания, направленным против или специфичным в отношении CD137.

45 [00121] В связи с этим настоящее раскрытие предусматривает один или более мутеинов hNGAL, которые способны к связыванию CD137 с аффинностью, измеренной по KD, составляющей 200 нМ или ниже, приблизительно 140 нМ или ниже, приблизительно 50

нМ или ниже и даже приблизительно 10 нМ или ниже. Более предпочтительно мутеины hNGAL могут характеризоваться аффинностью, измеренной по KD, составляющей приблизительно 5 нМ или ниже.

[00122] Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 в линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 17), замену.

[00123] Согласно конкретным вариантам осуществления мутеин липокалина по настоящему раскрытию содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или даже больше замен в положении в последовательности, соответствующем положению 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 последовательности в линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (номер доступа базы данных SWISS-PROT - P80188; SEQ ID NO: 2). Предпочтительно предусматривают, что настоящее раскрытие относится к мутеину липокалина, который содержит, в дополнение к одной или более заменам в положениях, соответствующих положениям 36, 87 и/или 96 в линейной полипептидной последовательности зрелого NGAL человека, в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 94, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 в линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL, замену.

[00124] Согласно еще некоторым дополнительным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид представляет собой мутеин hNGAL, который по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (номер доступа базы данных SWISS-PROT - P80188; SEQ ID NO: 17) содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или даже больше подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 в последовательности, и где указанный полипептид связывает CD137, в частности CD137 человека.

[00125] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий CD137 мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в любом одном или более из положений 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 последовательности в линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 17) один или более из следующих подвергнутых мутации аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg или Lys; Gln 49 → Val, Ile, His, Ser или Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, Ala или Gly; Leu 70 → Ala, Lys, Ser или Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, Thr или Asn; Trp 79 → Ala или Asp; Arg 81 → Met, Trp или Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr.

[00126] Согласно некоторым вариантам осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает два или более, а именно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, более того, как например: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или все подвергнутые мутации аминокислотные остатки в этих положениях в последовательности зрелого hNGAL.

[00127] Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию, который связывается с CD137, включает следующие аминокислотные замещения по сравнению с линейной полипептидной

последовательностью зрелого hNGAL:

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr или

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr.

[00128] В остальном участке, т.е. участке, отличающемся от положений 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 в последовательности, мутеин hNGAL по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) вне подвергнутых мутации положений в аминокислотной последовательности.

[00129] Согласно другому варианту осуществления мутеин hNGAL характеризуется по меньшей мере 70% или даже большей идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT - P80188).

[00130] Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления мутеин липокалина согласно настоящему раскрытию содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46 или их фрагмента или варианта.

5 [00131] Аминокислотная последовательность связывающего CD137 мутеина hNGAL по настоящему раскрытию может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, а именно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичностью, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью,
10 с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46.

[00132] Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина hNGAL с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46, структурные гомологи которой характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательностей,
15 составляющей более чем приблизительно 60%, предпочтительно более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 92% и наиболее предпочтительно более чем 95%, относительно указанного мутеина hNGAL.

[00133] Мутеин hNGAL согласно настоящему раскрытию можно получать с помощью мутагенеза встречающейся в природе формы липокалина 2 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из приведенных ниже иллюстративных замен, предусматривается в том случае, если только мутеин липокалина сохраняет свою способность связываться с CD137, и/или он характеризуется идентичностью с
25 последовательностью, впоследствии содержащей замену, в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, а именно по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или большая идентичность с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT - P80188).

30 [00134] В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящее раскрытие предусматривает мутеин hNGAL, который связывает CD137 с аффинностью, измеренной по KD, составляющей приблизительно 5 нМ или ниже.

С.Примерные пути применения, применения и получение слитых полипептидов

[00135] Согласно некоторым вариантам осуществления слитые полипептиды по настоящему раскрытию могут обеспечивать синергический эффект посредством двойного целенаправленного воздействия на CD137 и HER2. Например, как показано в ex-vivo анализах и на мышинных моделях, стимуляция CD137 NK-клеток повышает активность трастузумаба (Kohrt, H. et al, J Clin Invest. 2012 Mar; 122(3): 1066-75) путем усиления функции и активности NK-клеток.

40 [00136] Ввиду этого в медицине существует множество возможных применений слитых полипептидов по настоящему раскрытию.

[00137] Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к применению слитых полипептидов, раскрытых в данном документе для выявления CD137 и HER2 в образце, а также к соответствующему способу диагностирования.

45 [00138] Согласно другому аспекту в настоящем раскрытии описано применение одного или более слитых полипептидов, раскрытых в данном документе, или одной или более композиций, содержащих такие полипептиды, для одновременного связывания CD137 и HER2/neu.

[00139] Настоящее раскрытие также включает применение одного или более слитых полипептидов, которые описаны, для образования комплекса с CD137 и HER2.

[00140] Таким образом, согласно еще дополнительному аспекту настоящего раскрытия раскрытые один или более слитых полипептидов используют для выявления уровня CD137 и HER2. Такое применение может включать стадии приведения одного или более указанных слитых полипептидов, при соответствующих условиях, в контакт с образцом, который, как полагают, содержит CD137 и HER2, с обеспечением таким образом возможности образования комплекса между слитыми полипептидами и CD137 и HER2 и выявления комплекса по соответствующему сигналу. Выявляемый сигнал может быть обусловлен меткой, как разъяснено выше, или изменением физических свойств в результате связывания, т.е. образования комплекса как такового. Одним примером является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого изменяется в ходе связывания партнеров по связыванию, из которых один иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

[00141] Слитые полипептиды, раскрытые в данном документе, также можно применять для отделения CD137 и HER2. Такое применение может включать стадии приведения одного или более указанных слитых полипептидов, при соответствующих условиях, в контакт с образцом, который, как полагают, содержит CD137 и HER2, с обеспечением таким образом возможности образования комплекса между слитыми полипептидами и CD137 и HER2 и отделения комплекса от образца.

[00142] Согласно еще одному аспекту в настоящем раскрытии описан диагностический или аналитический набор, содержащий слитый полипептид согласно настоящему раскрытию.

[00143] Помимо их применения в диагностике, согласно еще одному аспекту настоящее раскрытие предполагает фармацевтическую композицию, содержащую слитый полипептид по настоящему раскрытию и фармацевтически приемлемый наполнитель.

[00144] Кроме того, настоящее раскрытие предусматривает слитые полипептиды, которые одновременно связывают CD137 и HER2, для применения в качестве противораковых средств и/или иммуномодуляторов. В силу этого слитые полипептиды по настоящему раскрытию предусматриваются для применения в способе лечения или предупреждения заболеваний человека, а именно ряда опухолей, в том числе определенных агрессивных типов рака молочной железы. Соответственно, также представлены способы лечения или предупреждения заболеваний человека, а именно ряда опухолей, в том числе определенных агрессивных типов рака молочной железы, у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества одного или более слитых полипептидов по настоящему раскрытию.

[00145] Путем одновременно целенаправленного воздействия на опухолевые клетки, в которых экспрессируется HER2/neu, и активации клеток естественных киллеров (NK) врожденной иммунной системы хозяина, находящихся в зоне таких опухолевых клеток, слитый полипептид по настоящему раскрытию может повышать целенаправленную активность Т-клеток против опухоли, усиливать противоопухолевый иммунитет и в то же время обладать непосредственным ингибирующим действием на рост опухоли, обеспечивая таким образом синергичные противоопухолевые ответы. Кроме того, путем локального ингибирования активности онкогена и индуцирования клеточно-опосредованной цитотоксичности с помощью NK-клеток, слитый полипептид по настоящему раскрытию может уменьшать побочные эффекты эффекторных лимфоцитов

в отношении здоровых клеток, т.е. нецелевую токсичность.

[00146] В Т-клетках опосредованная CD137 передача сигнала приводит к накоплению представителей семейства TRAF и активации некоторых киназ, в том числе ASK-1, MKK, MAPK3/MAPK4, p38 и JNK/SAPK. Активация киназ затем сопровождается активацией и транслокацией в ядро некоторых факторов транскрипции, в том числе ATF-2, Jun и NF-κB. Помимо усиления индуцированной Т-клеточным рецептором (TCR) пролиферации на субоптимальном уровне, опосредованная CD137 передача сигнала защищает Т-клетки, и в частности CD8+ Т-клетки, от индуцированной активацией клеточной смерти (AICD).

[00147] Настоящее раскрытие охватывает применение слитого полипептида по настоящему раскрытию или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для костимуляции Т-клеток и/или активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, при воздействии на опухолевые клетки, в которых экспрессируется HER2/neu.

[00148] В настоящем раскрытии также описан способ костимуляции Т-клеток и/или активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, при воздействии на опухолевые клетки, в которых экспрессируется HER2/neu, включающий применение одного или более слитых полипептидов по настоящему раскрытию или одной или более композиций, содержащих такие слитые полипептиды.

[00149] Вместе с этим настоящее раскрытие предусматривает способ активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, при воздействии на опухолевые клетки, в которых экспрессируется HER2/neu, включающий применение одного или более слитых полипептидов по настоящему раскрытию или одной или более композиций, содержащих такие слитые полипептиды.

[00150] Настоящее раскрытие также предполагает способ индуцирования пролиферации Т-лимфоцитов при воздействии на опухолевые клетки, в которых экспрессируется HER2/neu, включающий применение одного или более слитых полипептидов по настоящему раскрытию или одной или более композиций, содержащих такие слитые полипептиды.

[00151] Настоящее раскрытие охватывает применение слитого полипептида по настоящему раскрытию или композиции, содержащей такой слитый полипептид для направления образования скоплений CD137 и активации на Т-клетках по отношению к опухолевым клеткам, в которых экспрессируется HER2/neu.

[00152] Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает способ индуцирования локального ответа Т-клеток в окружающем пространстве HER2/neu-положительных опухолевых клеток, включающий применение таких слитых полипептидов. «Локальный» означает, что при связывании Т-клеток через CD137 и воздействии на HER2/neu-положительные опухолевые клетки, Т-клетки продуцируют цитокины, в частности IL-2 и/или IFN-гамма, в окружающее пространство HER2/neu-положительных клеток. Такие цитокины отражают активацию Т-клеток, которые впоследствии могут быть способны уничтожать HER2/neu-положительные опухолевые клетки либо непосредственно, либо опосредованно путем привлечения других клеток-киллеров, таких как Т-клетки или NK-клетки.

[00153] Согласно другому варианту осуществления настоящее раскрытие также относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие слитые полипептиды, раскрытые в данном документе. Согласно еще одному варианту осуществления настоящее раскрытие охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замены определенных кодонов

на другие кодоны, обозначающие ту же самую аминокислоту, настоящее раскрытие не ограничено конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, который описан в данном документе, а охватывает все молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый полипептид. В связи с этим настоящее раскрытие также относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим слитые полипептиды по настоящему раскрытию.

[00154] Согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутеин липокалина, раскрытый в данной заявке, такая как ДНК, может быть «функционально связана» с другой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин по настоящему раскрытию, для обеспечения экспрессии слитого полипептида, раскрытого в данном документе. В связи с этим функциональная связь представляет собой связь, при которой элементы последовательности одной молекулы нуклеиновой кислоты и элементы последовательности другой молекулы нуклеиновой кислоты соединены таким образом, который обеспечивает экспрессию слитого полипептида в виде единого полипептида.

[00155] Настоящее раскрытие также относится к способу получения слитого полипептида, при этом слитый полипептид по настоящему раскрытию получают, исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или любую его субъединицу, при помощи способов генной инженерии. Согласно некоторым вариантам осуществления способ можно осуществлять *in vivo*, при этом полипептид можно, например, получать в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине, а затем выделять из этого организма-хозяина или его культуры. Существует также возможность получения слитого полипептида по настоящему раскрытию *in vitro*, например, путем использования системы трансляции *in vitro*.

[00156] При получении слитого полипептида *in vivo* нуклеиновую кислоту, кодирующую такой полипептид, вводят в подходящий бактериальный или эукариотический организм-хозяин с помощью технологии с использованием рекомбинантной ДНК (как уже обозначалось выше). С этой целью клетку-хозяина сперва трансформируют вектором для клонирования, который включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, который описан в данном документе, с применением разработанных стандартных способов. Клетку-хозяина затем культивируют в условиях, которые обеспечивают экспрессию гетерологичной ДНК и таким образом синтез соответствующего полипептида. Впоследствии полипептид выделяют либо из клетки, либо из среды для культивирования.

[00157] Согласно одному варианту осуществления настоящего раскрытия способ включает воздействие по меньшей мере на одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую hNGAL, мутагенезом в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одно, иногда даже больше из положений в последовательности, соответствующих положениям 28, 40-52, 60, 68, 65, 70, 71-81, 87, 89, 96, 98, 100-106, 114, 118, 120, 125-137 и 145 последовательности в линейной полипептидной последовательности hNGAL (SEQ ID NO: 17).

[00158] К тому же согласно некоторым вариантам осуществления встречающаяся в природе дисульфидная связь между Cys 76 и Cys 175 может быть удалена в мутеинах hNGAL по настоящему раскрытию. Соответственно, такие мутеины можно получать в компартменте клетки со средой с восстановительным окислительно-восстановительным потенциалом, например в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

[00159] Настоящее раскрытие также включает молекулы нуклеиновой кислоты,

кодирующие мутеины липокалина по настоящему раскрытию, которые включают дополнительные мутации вне указанных положений в последовательности с экспериментальным мутагенезом. Такие мутации часто допустимы или могут даже оказаться преимущественными, например, если они способствуют улучшенной

5 эффективной сворачивания, стабильности в сыворотке крови, термостойкости или аффинности связывания с лигандом мутеинов липокалина.

[00160] Молекула нуклеиновой кислоты, раскрытая в данной заявке, может быть «функционально связана» с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями) для обеспечения экспрессии этой молекулы нуклеиновой

10 кислоты.

[00161] Молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК, называют «способной к экспрессии молекулой нуклеиновой кислоты» или способной «обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности», если она включает элементы последовательности, которые содержат информацию относительно транскрипционной и/или трансляционной

15 регуляции, и такие последовательности «функционально связаны» с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, при которой элементы регуляторной последовательности и последовательность, подлежащая экспрессии, соединены таким образом, который обеспечивает экспрессию гена. Определенные особенности регуляторных участков,

20 необходимых для экспрессии гена, могут варьировать между видами, но в общем эти участки включают промотор, который у прокариот содержит как промотор *per se*, т.е. элементы ДНК, направляющие инициацию транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрибировании в РНК, будут запускать сигнал об инициации трансляции. Такие промоторные участки, как правило, включают 5'-некодирующие последовательности,

25 вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, такие как боксы -35/-10 и элемент Шайн-Дальгарно у прокариот или ТАТА-бокс, последовательности СААТ и 5'-кэппирующие элементы у эукариот. Такие участки также могут включать энхансерные или репрессорные элементы, а также сигнальные последовательности трансляции и лидерные последовательности для нацеливания нативного полипептида на конкретный

30 компартмент клетки-хозяина.

[00162] К тому же 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, вовлеченные в терминацию транскрипции, полиаденилирование или им подобные. Однако, если такие последовательности терминации не удовлетворительны с точки зрения функциональности в конкретной клетке-хозяине,

35 тогда их можно заменить сигналами, функциональными в такой клетке.

[00163] Ввиду этого молекула нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию может включать регуляторную последовательность, такую как промоторную последовательность. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию включает промоторную

40 последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор *tet*, промотор *lacUV5* или промотор T7. Примерами промоторов, применимых для экспрессии в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор CMV.

[00164] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию также могут

45 быть частью вектора или любого другого типа средства для клонирования, а именно плазмиды, фагмиды, фага, бакуловируса, космиды или искусственной хромосомы.

[00165] Согласно одному варианту осуществления молекула нуклеиновой кислоты включена в фазмиду. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенный

участок умеренного фага, такого как M13 или f1, или его функциональную часть, слитую с представляющей интерес кДНК. После суперинфекции бактериальных клеток-хозяев таким фагмидным вектором и соответствующим хелперным фагом (например, M13K07, VCS-M13 или R408) продуцируются интактные фаговые частицы, обеспечивая

5 таким образом физическое сопряжение закодированной гетерологичной кДНК с ее соответствующим полипептидом, выведенным на поверхность фага (см., например, Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424 или Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93).

[00166] Такие средства для клонирования могут включать, помимо регуляторных

10 последовательностей, описанных выше, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, который описан в данном документе, последовательности для репликации и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином, которую используют для экспрессии, а также маркеры отбора, придающие селективируемый фенотип трансформированным или

15 трансфицированным клеткам. В данной области известно большое число подходящих векторов для клонирования, и они являются коммерчески доступными.

[00167] Молекулой ДНК, кодирующей слитый полипептид, который описан в данном документе (например, SEQ ID NO: 20 и 31), и в частности вектором для клонирования, содержащим кодирующую последовательность такого полипептида, можно

20 трансформировать клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформацию можно осуществлять с использованием стандартных методик. Таким образом, настоящее раскрытие также направлено на клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, которая раскрыта в данном документе.

[00168] Трансформированные клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих

25 для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый полипептид по настоящему раскрытию. Подходящие клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотическими, такими как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, клетками насекомых SF9 или High5, иммортализованными клеточными линиями млекопитающих (например, клетками

30 HeLa или клетками CHO) или первичными клетками млекопитающих.

[00169] Согласно некоторым вариантам осуществления, в том случае, если мутеин липокалина по настоящему раскрытию, в том числе который содержится в слитом полипептиде, раскрытом в данном документе, включает внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительным направлять образующийся

35 полипептид в компартмент клетки со средой с окисляющим окислительно-восстановительным потенциалом с помощью соответствующей сигнальной последовательности. Такая окисляющая среда может обеспечиваться периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или в просвете эндоплазматической сети эукариотических

40 клеток и, как правило, она способствует образованию дисульфидных связей в структуре.

[00170] Согласно некоторым вариантам осуществления также возможно получать слитый полипептид по настоящему раскрытию в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В данном случае полипептид может быть либо непосредственно получен в растворимом и свернутом состоянии, либо выделен в форме телец включения

45 с последующей ренатурацией *in vitro*. Дополнительной возможностью является применение конкретных штаммов-хозяев с окисляющей внутриклеточной средой, которая таким образом может обеспечивать образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.).

[00171] Согласно некоторым вариантам осуществления слитый полипептид по настоящему раскрытию, который описан в данном документе, можно создавать или получать необязательно только с применением генной инженерии. Предпочтительнее такой полипептид можно также получать путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез полипептидов Меррифилда, или путем транскрипции и трансляции *in vitro*. Например, возможно, что перспективные мутации определяют с помощью молекулярного моделирования и затем синтезируют необходимый (сконструированный) мутеин или полипептид *in vitro* и исследуют активность связывания в отношении представляющей интерес мишени. Способы твердофазного синтеза и/или синтеза в жидкой фазе белков хорошо известны в данной области (см., например, Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43).

[00172] Согласно другому варианту осуществления слитый полипептид по настоящему раскрытию можно получать путем транскрипции/трансляции *in vitro*, используя стандартные способы, известные специалистам в данной области.

[00173] Специалисту в данной области будут понятны способы, применимые для получения слитых полипептидов, предполагаемых настоящим раскрытием, но чьи последовательности белков или нуклеиновых кислот явным образом не раскрыты в данном документе. В качестве обзора такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез отдельных положений аминокислот для упрощения субклонирования подвергнутого мутации гена полипептида или его частей путем введения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. К тому же такие мутации можно также вводить для дополнительного улучшения аффинности слитого полипептида в отношении его мишеней (например, CD137 и HER2). Кроме того, мутации можно вводить для модулирования определенных характеристик полипептида, а именно для улучшения стабильности фолдинга, стабильности в сыворотке крови, устойчивости белка или растворимости в воде или для снижения склонности к агрегации, если в этом существует необходимость. Например, встречающиеся в природе остатки цистеина можно подвергать мутации в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидного мостика.

[00174] Дополнительные объекты, преимущества и особенности настоящего раскрытия станут очевидными специалисту в данной области при изучении следующих примеров и прилагаемых фигур, включающих их, которые не предназначены для ограничения. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее раскрытие конкретно раскрыто с помощью примерных вариантов осуществления и необязательных особенностей, к модификации и варианту раскрываемой информации, приведенной в них, раскрытой в данном документе, может прибегнуть специалист в данной области, и что такие модификации и варианты рассматриваются как часть объема настоящего раскрытия.

V. ПРИМЕРЫ

[00175] Пример 1. Экспрессия и анализ слитых полипептидов

[00176] Для одновременного связывания HER2 и CD137 в одно и то же время, авторы настоящего изобретения получали несколько репрезентативных слитых полипептидов, представляющих собой антитело-мутеин липокалина, сливая вместе антитело с тяжелой и легкой цепями, представленными под SEQ ID NO: 3 и 4, и мутеин липокалина с SEQ ID NO: 2 посредством неструктурированного линкера (G4S)₃ (SEQ ID NO: 19). Различные форматы, которые были сконструированы, показаны на фигуре 1. Такие слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14, SEQ ID NO:

15 и 16) получали посредством слияния мутеина липокалина с SEQ ID NO: 2 с любым одним из четырех концов подвергнутого мутации варианта антитела со сконструированным каркасом IgG4, который содержит мутацию S228P для сведения к минимуму обмена в половине антитела IgG4 in-vitro и in-vivo (см. Silva 2015), а также мутации F234A и L235A для ослабления взаимодействий с Fc-гамма рецептором (Alegre 1992). К тому же авторы настоящего изобретения получали слитый полипептид с SEQ ID NO: 7 и 8, в котором по сравнению со слитым полипептидом с SEQ ID NO: 9 и 10 имелась дополнительная мутация N297A в тяжелой цепи антитела (см. Bolt 1993) для удаления природного мотива гликозилирования. Это удаление могло теоретически также ослабить взаимодействие с Fc-гамма рецепторами. Кроме того, авторы настоящего изобретения получали слитый полипептид с SEQ ID NO: 5 и 6, который представляет собой непосредственное слияние мутеина липокалина с SEQ ID NO: 2 с С-концевой тяжелой цепью антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 с основой, представляющей собой IgG1, и таким образом слитый полипептид сохранял первоначальную степень взаимодействия с Fc-гамма антитела IgG1.

[00177] Конструкции получали путем синтеза генов и клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих. Их затем транзигентно экспрессировали в клетках CHO.

Концентрацию слитых полипептидов в среде с клеточной культурой измеряли при помощи сенсорного устройства с белком А от ForteBio (Pall Corp.) и количественно оценивали при помощи стандарта, представляющего собой IgG1 человека. Титры конструкций были такими, как описанные в таблице 1 ниже.

[00178] Таблица 1. Титры при экспрессии

<i>Название клона</i>	<i>Титр при экспрессии [мг/л]</i>
SEQ ID NO: 5 и 6	262
SEQ ID NO: 9 и 10	156
SEQ ID NO: 13 и 14	191
SEQ ID NO: 7 и 8	181
SEQ ID NO: 11 и 12	204
SEQ ID NO: 15 и 16	161

[00179] Слитые полипептиды очищали при помощи хроматографии с белком А с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS). После очистки при помощи SEC фракции, содержащие мономерный белок, объединяли и снова анализировали при помощи аналитической SEC. Согласно этому анализу слитые полипептиды были полностью мономерными без выявляемых мультимерных молекул или агрегатов.

[00180] Пример 2. Специфичность слитых полипептидов относительно HER2

[00181] Авторы настоящего изобретения применяли анализ ELISA для определения аффинности слитых белков в отношении рекомбинантного HER2 (Sino Biological). Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали после каждой стадии инкубации при помощи 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (объем/объем) Tween 20 (PBS-T), пять раз. Планшеты блокировали при помощи 2% BSA (вес/объем) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывали. Различные концентрации показательного антитела (SEQ ID NO: 3 и 4, трастузумаба или Herceptin®, Roche Diagnostics) или слитых

полипептидов добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывания. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации с разведенным в концентрации, составляющей 1:5000, конъюгированным с HRP антителом к Fc IgG человека (№109-035-098, Jackson Laboratory) в PBS-Т. После дополнительной стадии промывания в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo) и интенсивность флуоресценции выявляли при помощи планшет-ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00182] Результат эксперимента наносили на график на фигуре 2 совместно с аппроксимированными кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и наибольший сигнал были заданными параметрами, и наклон фиксировали для единства. Полученные в результате значения EC50 представлены в таблице 2, в том числе ошибки сигмоидальной функции данных. Наблюдаемые значения EC50 находились в аналогичном диапазоне для всех тестируемых слитых полипептидов (0,22-0,31 нМ) и в том же диапазоне, что и значение EC50 для показательного антитела (SEQ ID NO: 3 и 4), которое составляло 0,16 нМ.

[00183] Таблица 2. Данные ELISA в отношении связывания HER2

<i>Название средства</i>	<i>EC50 HER2 [нМ]</i>
SEQ ID NO: 7 и 8	0,24 ± 0,02
SEQ ID NO: 13 и 14	0,23 ± 0,01
SEQ ID NO: 15 и 16	0,31 ± 0,01
SEQ ID NO: 5 и 6	0,22 ± 0,01
SEQ ID NO: 9 и 10	0,28 ± 0,01
SEQ ID NO: 11 и 12	0,23 ± 0,01
SEQ ID NO: 3 и 4	0,16 0,01

[00184] Пример 3. Специфичность слитых полипептидов относительно CD137

[00185] Авторы настоящего изобретения использовали анализ ELISA для определения аффинности слитых полипептидов и положительного контроля, представляющего собой мутин липокалина с SEQ ID NO: 2, в отношении рекомбинантного слияния CD137-Fc (№838-4B-100, R&D Systems). Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали после каждой стадии инкубации при помощи 80 мкл PBS-Т пять раз. Планшеты блокировали при помощи 2% BSA (вес/объем) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывали. Различные концентрации специфичного в отношении CD137 мутеина липокалина в мономерной форме (SEQ ID NO: 2) или слитых полипептидов добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывания. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре с разведенным в концентрации, составляющей 1:1000, конъюгированным с HRP антителом к hNGAL в PBS-Т. После дополнительной стадии промывания в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo) и интенсивность флуоресценции выявляли при помощи планшет-ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00186] Результат эксперимента, который наносили на график, представлен на фигуре 3 совместно с кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и наибольший сигнал были заданными параметрами, и наклон фиксировали для единства. Полученные в результате значения

EC50 представлены в таблице 3, в том числе ошибки сигмоидальной функции данных. Наблюдаемые значения EC50 для всех тестируемых слитых полипептидов были почти одинаковыми в рамках экспериментальной ошибки и варьировались от 0,30 нМ до 0,47 нМ, незначительно недостигающего значения, полученного для положительного контроля, представляющего собой мутеин липокалина с SEQ ID NO: 2, которое составляло 0,49 нМ.

[00187] Таблица 3. Данные ELISA в отношении связывания CD137

<i>Название средства</i>	<i>EC50 CD137 [нМ]</i>
SEQ ID NO: 7 и 8	0,30 ± 0,02
SEQ ID NO: 13 и 14	0,33 ± 0,05
SEQ ID NO: 15 и 16	0,35 ± 0,03
SEQ ID NO: 5 и 6	0,41 ± 0,04
SEQ ID NO: 9 и 10	0,37 ± 0,06
SEQ ID NO: 11 и 12	0,47 ± 0,06
SEQ ID NO: 2	0,49 ± 0,09

[00188] Пример 4. Демонстрация одновременного связывания мишени в основанных на ELISA условиях

[00189] Для демонстрации одновременного связывания слитых полипептидов с HER2 и CD137 применяли формат ELISA с двойным связыванием. Рекомбинантный HER2 (Sino Biological) в PBS (5 мкг/мл) наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации при помощи 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (объем/объем) Tween 20 (PBS-T), с использованием установки для избирательного промывания планшетов с глубокими лунками Biotek ELx405. Планшеты блокировали при помощи 2% BSA (вес/объем) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре и затем снова промывали. В лунки добавляли различные концентрации слитых полипептидов и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывания. Затем добавляли биотинилированный CD137 человека-Fc в постоянной концентрации, составляющей 1 мкг/мл, в PBS-T на 1 ч. После промывания в лунки на 1 ч добавляли экстравидин-HRP (Sigma-Adrich, 1:5000 в PBS-T). После дополнительной стадии промывания в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат с HRP (QuantaBlu, Thermo) и интенсивность флуоресценции выявляли при помощи планшет-ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00190] Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на фигуре 4. Все тестируемые слитые полипептиды характеризовались отчетливыми сигналами связывания со значениями EC50, находящимися в диапазоне от 1 до 4 нМ, демонстрируя, что эти слитые полипептиды способны связывать HER2 и CD137 одновременно.

[00191] Пример 5. Функциональный анализ активации Т-клеток с использованием нанесенных слитых полипептидов

[00192] Авторы настоящего изобретения использовали анализ активации Т-клеток для оценки способности слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16 костимулировать ответы Т-клеток. С этой целью, слитый полипептид с SEQ ID NO: 15 и 16 в различных концентрациях наносили на пластиковую чашку совместно с антителом к CD3 человека (ОКТ3, eBioscience), а затем очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности. В качестве показателей для считывания авторы настоящего изобретения оценивали длительную пролиферацию Т-клеток после трех дней инкубации с использованием импульсного мечения BrdU в течение 4 ч и измеряли уровни интерлейкина 2 (IL-2) в супернатанте. Ниже авторы настоящего изобретения приводят

подробное описание эксперимента.

[00193] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) от здоровых доноров-добровольцев выделяли из лейкоцитарных пленок путем центрифугирования в градиенте плотности полисахарозы (Bicoll 1,077 г/мл от Biochrom), следуя протоколу компании Biochrom. Т-лимфоциты выделяли из полученных в результате PBMC с использованием набора для очистки Pan T-cell purification Kit (Miltenyi Biotec GmbH) и протоколов изготовителя. Очищенные Т-клетки повторно суспендировали в буфере, состоящем из 90% FCS и 10% DMSO, немедленно замораживали с помощью жидкого азота и хранили в жидком азоте до последующего использования. Для анализа Т-клетки оттаивали в течение 16 ч и культивировали в культуральной среде (RPMI 1640, Life Technologies), дополненной 10% FCS и 1% смеси пенициллин-стрептомицин (Life Technologies).

[00194] Следующую процедуру проводили с использованием трех повторов для каждого экспериментального условия. На плоскодонные планшеты для культур тканей наносили на ночь при 4°C 200 мкл смеси из 0,5 мкг/мл антитела к CD3 и слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16 в концентрации, составляющей 3 мкг/мл, 10 мкг/мл и 30 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля захватывали исключительно антитело к CD3, т.е. без добавления слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16. На следующий день лунки промывали дважды с использованием PBS и в каждую лунку добавляли 100 мкл суспензии Т-клеток (соответствующей 5×10^4 Т-клеток) в культуральной среде. Планшеты накрывали газопроницаемой уплотняющей пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 дней. Далее оценивали концентрацию IL-2 в супернатанте, а также клеточную пролиферацию.

[00195] Для того, чтобы количественно оценить Т-клеточную пролиферацию, использовали набор для ELISA для определения хемилюминесцентного сигнала при клеточной пролиферации, основанный на включении BrdU (Roche), согласно инструкциям изготовителя. Вкратце, в день 3 10 мкл раствора для мечения с BrdU добавляли в каждую лунку и пролиферации предоставляли возможность проходить в течение дополнительных 4 ч при 37°C в условиях увлажненной атмосферы с 5% CO₂. Планшеты центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, и супернатанты трех повторов объединяли, и сразу помещали для хранения при -20°C для дальнейшего количественного измерения уровней IL-2. Далее планшеты сушили при 60°C в течение 1 часа. 200 мкл раствора «FixDenat» добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Включенный BRDU метили меченным пероксидазой антителом к BrdU путем 2 ч инкубации при комнатной температуре. Уровни BrdU оценивали путем количественного анализа катализируемой пероксидазой, испускающей хемилюминесцентный сигнал, реакции в планшет-ридере PheraStar FS.

[00196] Уровни IL-2 человека в супернатантах клеточных культур количественно измеряли при помощи набора DuoSet для IL-2 от R&D Systems. Процедуру осуществляли, и она описана ниже. На первой стадии на 384-луночный планшет наносили при комнатной температуре на 2 ч 1 мкг/мл «антитела для захвата IL-2 человека» (R&D System), разведенного в PBS. Затем лунки промывали 5 раз с использованием 80 мкл PBS-T (PBS, содержащего 0,05% Tween20) с использованием установки для избирательного промывания планшетов с глубокими лунками Biotek EL405 (Biotek). После блокирования в течение 1 ч в PBS-T, дополнительно содержащем 1% казеина (вес/вес), объединенный супернатант и серию концентраций стандарта IL-2, разведенного в культуральной среде, инкубировали в 384-луночном планшете в течение ночи при

4°C. Для обеспечения возможности выявления и количественного измерения захваченного IL-2 смесь из 100 нг/мл биотинилированного антитела козы к hIL-2-Bio для выявления (R&D System) и 1 мкг/мл меченного сульф-меткой стрептавидина (Mesoscale Discovery) добавляли в PBS-T, содержащий 0,5% казеина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания 25 мкл буфера для считывания добавляли в каждую лунку и электрохемилюминесцентный (ECL) сигнал в каждой лунке считывали с помощью планшет-ридера Mesoscale Discovery. Анализ и количественное измерение проводили с использованием программного обеспечения от Mesoscale Discovery.

[00197] Результат оценки Т-клеточной пролиферации показан на фигуре 5. Имеет место существенное усиление длительной пролиферации после 3 дней инкубации в лунках, на которые были нанесены 10 мкг/мл и 30 мкг/мл слитого полипептида с SEQ ID NO: 15 и 16, в сравнении с отрицательным контролем, который не содержал слитый полипептид с SEQ ID NO: 15 и 16, и где захватывали исключительно антитело к CD3.

[00198] Из результата измерения уровня IL-2 видно, что слитый полипептид с SEQ ID NO: 15 и 16 может приводить к успешной активации Т-клеток (данные не показаны).

[00199] Пример 6. Функциональный анализ активации Т-клеток с использованием связанных с опухолевыми клетками слитых полипептидов

[00200] Авторы настоящего изобретения использовали анализ зависимой от клетки-мишени активации Т-клеток для оценки способности слитых полипептидов с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, способных к связыванию CD137 и HER2 в одно и то же время, костимулировать ответы Т-клеток при иммобилизации на HER2-положительной клеточной линии. В качестве отрицательного контроля авторы настоящего изобретения использовали

моноспецифическое связывающее HER2 антитело с SEQ ID NO: 3 и 4. В качестве дополнительного контроля эксперимент проводили в присутствии избытка моноспецифического связывающего HER2 антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 для вытеснения биспецифических конструкций с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16 из связывания с HER2-положительными клетками. В

эксперименте антитело к CD3 человека (ОКТ3, eBioscience) наносили на пластиковую чашку для культивирования, а затем HER2-положительные клетки SKBR3

культивировали на чашке в течение ночи. На следующий день очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности в присутствии разных концентраций слитых полипептидов с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO:

15 и 16 или контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4. В качестве показателя для считывания авторы настоящего изобретения измеряли уровни интерлейкина 2 (IL-2) и интерферона- γ (IFN- γ) в супернатанте. Эксперимент более подробно описан ниже.

[00201] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) от здоровых доноров-добровольцев выделяли из лейкоцитарных пленок путем центрифугирования в градиенте плотности полисахарозы (Bioscoll 1,077 г/мл от Biochrom), следуя протоколу компании Biochrom. Т-лимфоциты выделяли из полученных в результате PBMC с использованием набора для очистки Pan T-cell purification Kit (Miltenyi Biotec GmbH) и протоколов изготовителя. Очищенные Т-клетки повторно суспендировали в буфере, состоящем из 90% FCS и 10% DMSO, немедленно замораживали с помощью жидкого азота и хранили в жидком азоте до последующего использования. Для анализа Т-клетки оттаивали в течение 16 ч, и их культивировали в культуральной среде (RPMI 1640, Life Technologies), дополненной 10% FCS и 1% смеси пенициллин-стрептомицин (Life Technologies).

[00202] Следующую процедуру проводили с использованием трех повторов для каждого экспериментального условия. На плоскодонные планшеты для культур тканей предварительно наносили на 1 ч при 37°C 200 мкл 0,25 мкг/мл антитела к CD3 или не наносили его. Затем планшеты дважды промывали с использованием PBS. Высеивали

5 5×10^4 опухолевых клеток SKBR3 на лунку и обеспечивали возможность прилипания в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки SKBR3

предварительно выращивали в культуре при стандартных условиях, отделяли при помощи Accutase и повторно суспендировали в культуральной среде.

10 [00203] В последующие дни опухолевые клетки обрабатывали 2 часа при 37°C митомицином C (Sigma Aldrich) в концентрации, составляющей 30 мкг/мл, для блокирования их пролиферации. Планшеты дважды промывали с использованием PBS

и в каждую лунку добавляли 100 мкл суспензии Т-клеток (соответствующей 5×10^4 Т-клеток), и каждый из четырех слитых полипептидов в одиннадцати разных

15 концентрациях, находящихся в диапазоне от 25 мкг/мл до 0,4 нг/мл, или отрицательный контроль в концентрациях, составляющих 25 мкг/мл, 0,1 мкг/мл и 0,4 нг/мл. Параллельно проводили аналогично построенный эксперимент, но с добавлением конечной

концентрации, составляющей 50 мкг/мл, моноспецифического связывающего HER2 антитела с SEQ ID NO: 3 и 4. Планшеты накрывали газопроницаемой уплотняющей

20 пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 дней. Затем оценивали концентрацию IL-2 и IFN- γ в супернатанте, как описано ниже.

[00204] Уровни IL-2 человека в супернатантах клеточных культур количественно измеряли при помощи набора DuoSet для IL-2 и набора DuoSet для IFN- γ от R&D Systems

25 соответственно. Процедуру осуществляли аналогично для обоих цитокинов и описывали ниже только для IL-2. На первой стадии на 384-луночный планшет наносили при комнатной температуре на 2 ч 1 мкг/мл «антитела для захвата IL-2 человека» (R&D System), разведенного в PBS. Затем лунки промывали 5 раз с использованием 80 мкл PBS-T (PBS, содержащего 0,05% Tween20) с использованием установки для

30 избирательного промывания планшетов с глубокими лунками Biotek EL405 (Biotek). После блокирования в течение 1 ч в PBS-T, дополнительно содержащем 1% казеина (вес/вес), объединенный супернатант и серию концентраций стандарта IL-2, разведенного

в культуральной среде, инкубировали в 384-луночном планшете в течение ночи при 4°C. Для обеспечения возможности выявления и количественного измерения захваченного IL-2 смесь из 100 нг/мл биотинилированного антитела козы к hIL-2-Bio для выявления (R&D System) и 1 мкг/мл меченного сульф-меткой стрептавидина (Mesoscale Discovery) добавляли в PBS-T, содержащий 0,5% казеина, и инкубировали

35 при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания 25 мкл буфера для считывания добавляли в каждую лунку и электрохемилюминесцентный (ECL) сигнал в каждой лунке считывали с использованием планшет-ридера Mesoscale Discovery.

40 Анализ и количественное измерение проводили с использованием программного обеспечения от Mesoscale Discovery. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50, фоновым уровнем и уровнем плато в качестве заданных параметров и наклоном, который фиксировали для единства. Фактор индукции рассчитывали исходя из подобранных величин в качестве коэффициента уровня плато и фонового уровня.

[00205] Результат репрезентативного эксперимента в отношении биспецифического слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 показан на фигуре 6. Из данных видно

отчетливое повышение уровней как IL-2 (фигура 6A), так и IFN- γ (фигура 6C) в супернатанте пропорционально увеличению концентраций биспецифического слитого полипептида. При низких концентрациях биспецифического слитого полипептида концентрация IL-2 и IFN- γ , измеренная в супернатанте, соответствует фоновому уровню, измеренному при отрицательном контроле, представляющем собой SEQ ID NO: 3 и 4. В присутствии избытка связывающего HER2 средства с SEQ ID NO: 3 и 4 концентрации как IL-2 (фигура 6B), так и IFN- γ (фигура 6D) более не проявляют зависимое от концентрации SEQ ID NO: 9 и 10 повышение, а остаются неизменным на фоновом уровне.

[00206] Несмотря на то, что уровни плато, достигнутые в эксперименте, являются более низкими для SEQ ID NO: 11 и 12 (фигура 7) и SEQ ID NO: 15 и 16 (фигура 9), общие результаты относительно зависимой от концентрации индукции IL-2 и IFN- γ и блокирования избытком SEQ ID NO: 3 и 4 являются сходными. В отличие от этого не наблюдается видимого повышения концентрации IL-2 или IFN- γ пропорционально повышению концентрации слияния полипептидов с SEQ ID NO: 13 и 14 (фигура 8).

[00207] Значения EC50 и факторы индукции, полученные из сигмоидальной функции для данных, представлены в таблице 4, в том числе данных, полученных в результате независимого повтора эксперимента с участием разных доноров PBMC. Из данных видно, что значения EC50 сопоставимы для SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12 и SEQ ID NO: 15 и 16. При этом фактор индукции убывает в следующем порядке SEQ ID NO: 9 и 10 > SEQ ID NO: 11 и 12 > SEQ ID NO: 15 и 16.

[00208] В данном эксперименте отчетливо видна потенциальная функциональная активность SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12 и SEQ ID NO: 15 и 16, тогда как SEQ ID NO: 13 и 14 не проявляли активность. С учетом почти одинаковых аффинностей для всех конструкций, показанных в примерах 4 и 5, это указывает на важную роль геометрии конструкции.

Таблица 4

	Активность в отношении IL-2 [EC50]	Активность в отношении IFN-g [EC50]	Эффективность в отношении IL-2 (макс./мин.)	Эффективность в отношении IFN-g (макс./мин.)
SEQ ID NO: 9 и 10	0,49 нМ (0,33/0,65)	0,29 нМ (0,25/0,33)	7,1 (7,5/6,7)	2,7 (2,5/2,8)
SEQ ID NO: 11 и 12	0,65 нМ (0,72/0,57)	0,55 нМ (0,45/0,64)	5,5 (6,5/4,4)	2,8 (2,9/2,7)
SEQ ID NO: 13 и 14	-	-	-	-
SEQ ID NO: 15 и 16	0,53 нМ (0,55/0,50)	0,38 нМ (0,45/0,30)	3,9 (4,1/3,7)	2 (2,1/1,8)

[00209] Пример 7. Аффинность в отношении Fc-гамма рецепторов hFc γ RI/CD64 и hFc γ RIIIA/CD16a

[00210] Для измерения аффинностей связывания слияний полипептидов со сконструированным каркасом на основе IgG4 (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16) с Fc-гамма рецепторами hFc γ RI/CD64 (R&D Systems) и hFc γ RIIIA/CD16a (R&D Systems) использовали анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SEQ ID NO: 3 и 4 служили в качестве

контроля, представляющего собой моноспецифическое антитело с каркасом IgG1. SEQ ID NO: 5 и 6 служили в качестве контроля, представляющего собой слияние полипептидов с основанием в виде IgG1. В анализе аффинности с помощью SPR слияния полипептидов биотинилировали и захватывали на сенсорном чипе CAP с использованием набора для захвата биотина Biotin CAPture Kit (GE Healthcare). На сенсорном чипе CAP

предварительно иммобилизировали олигонуклеотид ssDNA. Неразведенный реагент для захвата биотина Biotin CAPture Reagent (стрептавидин, конъюгированный с комплементарным олигонуклеотидом ss-DNA) наносили при скорости потока, составляющей 2 мкл/мин, в течение 300 с. Затем 10 мкг/мл биотинилированного слияния полипептидов наносили в течение 300 с при скорости потока, составляющей 5 мкл/мин. SEQ ID NO: 3 и 4 и слияния полипептидов биотинилировали путем инкубации с EZ-Link® NHS-PEG4-биотином (Thermo Scientific) в течение двух часов при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего реагента с биотином удаляли путем загрузки реакционной смеси в планшет для обессоливания для применения в формате с вращением Zeba™ Spin Desalting Plate (Thermo Scientific). В эталонный канал загружали только реагент из набора для захвата биотина Biotin CAPture Reagent.

[00211] Для определения аффинности готовили три разведения hFcγ RI/CD64 (в концентрации 40, 8 и 1,6 или в концентрации 100, 25 и 6 нМ) или четыре-пять разведений hFcγ RIIIA/CD16a (в концентрации 200, 40, 8 и 1,6 нМ или в концентрации 1000, 333, 111, 37 и 12 нМ) в подвижном буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 3 mM EDTA, pH 7,4 (GE Healthcare)) и наносили на поверхность чипа. При нанесении со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин время контакта образца составляло 180 с, и время диссоциации составляло 1800/2700 с для hFcγ RI/CD64 или 300 с для hFcγ RIIIA/CD16a. Все измерения проводили при 25°C.

Восстановление поверхности сенсорного чипа CAP выполняли при помощи введения 6 M Gua-HCl с 0,25 M NaOH с последующими дополнительным промыванием подвижным буфером и периодом стабилизации, составляющим 120 с. Перед измерениями уровня белка проводили три цикла восстановления с целью приведения к требуемым условиям. Данные оценивали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (V 2.0). Применяли двойное сравнение с образцом. Для hFcγ RI/CD64 использовали модель связывания 1:1 для аппроксимирования первичных данных. Для hFcγ RIIIA/CD16a использовали модель аффинности в равновесном состоянии для аппроксимирования первичных данных.

[00212] В таблице 5 показаны результаты аппроксимирования данных для hFcγ RI/CD64. Оба тестируемых продукта на основе IgG1 с SEQ ID NO: 3 и 4 и SEQ ID NO: 5 и 6 были на уровне 0,3 нМ, что указывало на то, что на связывание hFcγ RI/CD64 не влияло слияние с SEQ ID NO: 3 и 4 в отношении белка антикалина. Слияния полипептидов с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16 не проявили выявляемого связывания с hFcγ RI/CD64. Из этих данных видно, что связывание с hFcγ RI/CD64 может быть снижено до степени ниже выявляемого предела путем смены изотипа с IgG1 на сконструированный IgG4.

[00213] Таблица 5

Название клона	KD [нМ]
SEQ ID NO: 3 и 4	0,3
SEQ ID NO: 5 и 6	0,3
SEQ ID NO: 9 и 10	не определяемая
SEQ ID NO: 11 и 12	не определяемая
SEQ ID NO: 13 и 14	не определяемая
SEQ ID NO: 15 и 16	не определяемая

[00214] В таблице 6 показаны результаты аппроксимирования данных для hFcγ RIIIA/CD16a. Полученные в результате аффинности связывания в отношении hFcγ RIIIA/CD16a тестируемых продуктов на основе IgG1 с SEQ ID NO: 3 и 4 и SEQ ID NO: 5 и 6 были сопоставимыми друг с другом и составляли около 350 нМ, тогда как слияния полипептидов с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16 не проявили выявляемого связывания с hFcγ RIIIA/CD16a. Из этих данных видно, что связывание с hFcγ RIIIA/CD16a может быть снижено до степени ниже выявляемого предела путем смены изотипа с IgG1 на сконструированный IgG4.

[00215] Таблица 6

Название	KD [нМ]
SEQ ID NO: 3 и 4	335 ± 64
SEQ ID NO: 5 и 6	369 ± 76
SEQ ID NO: 9 и 10	не определяемая
SEQ ID NO: 11 и 12	не определяемая
SEQ ID NO: 13 и 14	не определяемая
SEQ ID NO: 15 и 16	не определяемая

[00216] Пример 8. Аффинность в отношении неонатального Fc-рецептора

[00217] Для измерения аффинностей связывания слияний полипептидов со сконструированным каркасом на основе IgG4 (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16) с неонатальным Fc-рецептором (FcRn, Sino Biologicals, № СТ009-H08H) использовали анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SEQ ID NO: 3 и 4 служили в качестве контроля, представляющего собой моноспецифическое антитело с каркасом IgG1. SEQ ID NO: 5 и 6 служили в качестве контроля, представляющего собой слияние полипептидов с основанием в виде IgG1. В анализе аффинности с помощью SPR FcRn ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare) согласно инструкциям изготовителя. Вкратце, после активации карбоксильных групп декстрановой матрицы 1-этил-3-(3-диметиламинпропил)-карбодиимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) первичным аминам белка FcRn позволяли вступать в реакцию со сложным эфиром NHS на поверхности до достижения сигнала, составляющего ~200 RU. В конечном итоге непрореагировавшие сложные эфиры NHS блокировали путем пуска раствора 1 М этаноламина по поверхности. Скорость потока на протяжении всей процедуры иммобилизации составляла 10 мкл/мин.

[00218] Для определения их аффинности готовили шесть разведений (1000 нМ, 333 нМ, 111 нМ, 37 нМ, 12 нМ и 4 нМ) всех конструкций в подвижном буфере (10 mM

HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 3 mM EDTA, pH 6,0) и наносили на поверхность чипа. При нанесении со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин время контакта образца составляло 180 с, и время диссоциации составляло 30 с. Все измерения проводили при 25°C. Восстановление поверхности сенсорного чипа CAP выполняли при помощи введения 10 mM глицина, pH 3,0. Перед измерениями уровня белка проводили три цикла восстановления с целью приведения к требуемым условиям. Данные оценивали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation (V 2.0) с двойным сравнением. Для аппроксимирования первичных данных использовали модель аффинности в равновесном состоянии.

[00219] Полученные в результате аффинности связывания для всех слияний полипептидов с FcRn находились в диапазоне 1-2 мкМ, что указывает на то, что смена изоформа с IgG1 на IgG4 не оказывает выявляемого влияния на связывание FcRn.

[00220] Таблица 7

Название	KD [мкМ]
SEQ ID NO: 3 и 4	2,0 ± 0,2
SEQ ID NO: 5 и 6	1,1 ± 0,03
SEQ ID NO: 11 и 12	1,3 ± 0,07
SEQ ID NO: 13 и 14	1,8 ± 0,04
SEQ ID NO: 9 и 10	1,7 ± 0,05
SEQ ID NO: 13 и 14	1,8 ± 0,01

[00221] Пример 9. Функциональный анализ активации Т-клеток с использованием опухолевых клеток с высоким и низким уровнями HER2

[00222] Авторы настоящего изобретения использовали анализ зависимой от клетки-мишени активации Т-клеток для оценки способности слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 костимулировать ответы Т-клеток в зависимости от уровней экспрессии HER2 в целевой клетке. Для этой цели авторы настоящего изобретения использовали клетки SKBR3 и BT474 с высоким уровнем экспрессии HER2, а также клетки, экспрессирующие HER2 на уровне, подобном здоровым экспрессирующим HER2 клеткам, HepG2 и MCF7. Для сравнения авторы настоящего изобретения исследовали поведение эталонных моноклональных антител к CD137 с SEQ ID NO: 47 и 48 и SEQ ID NO: 49 и 50. В качестве отрицательного контроля авторы настоящего изобретения использовали моноспецифическое связывающее HER2 антитело с SEQ ID NO: 3 и 4. В качестве дополнительного отрицательного контроля эксперимент выполняли без добавления тестируемого продукта («контроль, представляющий собой среду»). В эксперименте антитело к CD3 человека (ОКТ3, eBioscience) наносили на пластиковые чашки для культивирования, а затем клетки SKBR3, BT474, HepG2 или MCF7 отдельно культивировали на чашках в течение ночи. На следующий день очищенные Т-клетки инкубировали на покрытой поверхности в присутствии разных концентраций слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10, эталонных антител с SEQ ID NO: 47 и 48 и SEQ ID NO: 49 и 50, контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 или при отсутствии добавленного тестируемого продукта. В качестве показателя для считывания авторы настоящего изобретения измеряли уровни интерлейкина 2 (IL-2) в супернатанте. Эксперимент более подробно описан ниже.

[00223] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) от здоровых доноров-добровольцев выделяли из лейкоцитарных пленок путем центрифугирования в градиенте плотности полисахарозы (Bioscoll 1,077 г/мл от Biochrom), следуя протоколу компании Biochrom. Т-лимфоциты выделяли из полученных в результате PBMC с

использованием набора для очистки Pan T-cell purification Kit (Miltenyi Biotec GmbH) и протоколов изготовителя. Очищенные Т-клетки повторно суспендировали в буфере, состоящем из 90% FCS и 10% DMSO, немедленно замораживали с помощью жидкого азота и хранили в жидком азоте до последующего использования. Для анализа Т-клетки
 5 оттаивали в течение 16 ч, и их культивировали в культуральной среде (RPMI 1640, Life Technologies), дополненной 10% FCS и 1% смеси пенициллин-стрептомицин (Life Technologies).

[00224] Следующую процедуру проводили с использованием трех повторов для каждого экспериментального условия. На плоскодонные планшеты для культур тканей
 10 предварительно наносили на 1 ч при 37°C 200 мкл 0,25 мкг/мл антитела к CD3 или не наносили его. Затем планшеты дважды промывали с использованием PBS. Высевали 5×10^4 целевых опухолевых клеток на лунку и обеспечивали возможность прилипания в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Целевые клетки
 15 предварительно выращивали в культуре при стандартных условиях, отделяли при помощи Accutase и повторно суспендировали в культуральной среде.

[00225] В последующие дни опухолевые клетки обрабатывали 2 часа при 37°C митомицином C (Sigma Aldrich) в концентрации, составляющей 30 мкг/мл, для блокирования их пролиферации. Планшеты дважды промывали с использованием PBS
 20 и в каждую лунку добавляли 100 мкл суспензии Т-клеток (соответствующей 5×10^4 Т-клеток) и SEQ ID NO: 9 и 10, эталонные антитела с SEQ ID NO: 47 и 48 и SEQ ID NO: 49 и 50 или отрицательный контроль, представляющий собой SEQ ID NO: 3 и 4 или среду, в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,05 нМ до 5 нМ (за исключением BT474, концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 50 нМ). Планшеты накрывали
 25 газопроницаемой уплотняющей пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 дней. Затем оценивали концентрацию IL-2 в супернатанте, как описано ниже.

[00226] Уровни IL-2 человека в супернатантах клеточных культур количественно измеряли с помощью набора DuoSet для IL-2 от R&D Systems. На первой стадии на 384-
 30 луночный планшет наносили при комнатной температуре на 2 ч 1 мкг/мл «антитела для захвата IL-2 человека» (R&D System), разведенного в PBS. Затем лунки промывали 5 раз с использованием 80 мкл PBS-T (PBS, содержащего 0,05% Tween20) с использованием установки для избирательного промывания планшетов с глубокими лунками Biotek EL405 (Biotek). После блокирования в течение 1 ч в PBS-T, дополнительно
 35 содержащем 1% казеина (вес/вес), объединенный супернатант и серию концентраций стандарта IL-2, разведенного в культуральной среде, инкубировали в 384-луночном планшете в течение ночи при 4°C. Для обеспечения возможности выявления и количественного измерения захваченного IL-2 смесь из 100 нг/мл биотинилированного антитела козы к hIL-2-Bio для выявления (R&D System) и 1 мкг/мл меченного сульфо-
 40 меткой стрептавидина (MesoScale Discovery) добавляли в PBS-T, содержащий 0,5% казеина, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания 25 мкл буфера для считывания добавляли в каждую лунку и электрохемилюминесцентный (ECL) сигнал в каждой лунке считывали с помощью планшет-ридера MesoScale Discovery. Анализ и количественное измерение проводили с
 45 использованием программного обеспечения от MesoScale Discovery.

[00227] Результат репрезентативного эксперимента показан на фигуре 11. На этой фигуре значения наносили на график относительно фонового уровня продуцирования IL-2 при отсутствии тестируемого соединения, и таким образом они представляют

кратное изменение по сравнению с фоном. Хотя отрицательный контроль, представляющий собой SEQ ID NO: 3 и 4 (фигура 11A), не приводит к индукции IL-2 на Т-клетках с любой из четырех клеточных линий, возрастающие концентрации биспецифического слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 (фигура 11A) индуцируют

5 продуцирование IL-2 Т-клетками в присутствии клеток SKBR3 и BT474, экспрессирующих HER2 на высоком уровне. Однако какого-либо увеличения уровня IL-2 в результате воздействия SEQ ID NO: 9 и 10 не наблюдали для клеток HerG2 и MCF7. Такое поведение заметно отличается как от первого антитела к CD137 с SEQ ID NO: 47 и 48, которое индуцирует IL-2 на Т-клетках в присутствии всех четырех клеточных линий (фигура

10 11B), так и от второго антитела к CD137 с SEQ ID NO: 49 и 50, которое не приводит к индукции IL-2 на любой из четырех клеточных линий (фигура 11C).

[00228] Данный эксперимент демонстрирует, что белок слияния, обозначенный как SEQ ID NO: 9 и 10, активирует Т-клетки таким образом, что это зависит от плотности HER2 целевых клеток. Хотя клетки SKBR3 и BT474, экспрессирующие HER2 на высоком

15 уровне, проявляли отчетливую активацию Т-клеток, которая измерена по продуцированию IL-2, такого эффекта не наблюдали с клетками HerG2 и MCF7, которые экспрессируют HER2 при существенно более низком уровне. То, что этот эффект объясняется плотностью HER2, а не возможным ингибированием или недостаточностью костимуляции, обусловленными исследуемой клеткой, что делает передачу сигнала

20 CD137 неэффективной, становится очевидным вследствие того факта, что антитело к CD137 с SEQ ID NO: 47 и 48 способно активировать Т-клетки посредством передачи сигнала CD137 во всех четырех типах клеток.

[00229] Пример 10. 4-Недельное исследование стабильности слитых полипептидов в буфере при нейтральном показателе pH и повышенной температуре

[00230] Для изучения стабильности слитого полипептида, обозначенного как SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, авторы настоящего изобретения прибегли к эксперименту, в ходе которого образцы

25 инкубировали в течение 4 недель при 40°C в PBS, pH 7,4, при концентрации примерно 20 мг/мл (диапазон 21-23 мг/мл). Для сравнения авторы настоящего изобретения изучали поведение полипептида, обозначенного как SEQ ID NO: 3 и 4, при идентичных условиях. Образцы концентрировали от концентрации около 5 мг/мл до около 20 мг/мл с использованием центрифужных фильтров (Ultracel-3K, Amicon) и часть этого сконцентрированного образца хранили при -20°C в качестве эталонного материала.

30 0,1 мл концентрированного образца в 0,5 мл пробирках (PCR-PT, Sarstedt) затем хранили в инкубаторе (Mettler) в течение 4 недель при 40°C. Для изучения целостности и мономерного состава образца в дальнейшем его подвергали аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием колонки Superdex200 Increase на системе Agilent 1200 серии GPC2 при скорости потока, составляющей 0,150 мл/мин. 20 мкг образца наносили на колонку. Относительную концентрацию белка в

40 непрерывном потоке элюата выявляли по абсорбции при длине волны 280 нм.

[00231] Как указано, на фигуре 12 представлены результаты анализа с помощью SEC для всех слитых полипептидов и контроля, представляющего собой SEQ ID NO: 3 и 4. Соответствующие нижние и верхние кривые, полученные с помощью SEC, для каждого слитого полипептида соответствуют эталонному материалу и материалу, который соответственно инкубировали в течение 4 недель при 40°C. При сравнении эталонного материала и инкубированного материала обнаруживали, что кривая, полученная при помощи SEC, в значительной степени не изменяется для любого из биспецифических слитых полипептидов или контроля, представляющего собой SEQ ID

NO: 3 и 4, что указывает на стабильность слитых полипептидов в отношении агрегации.

[00232] Пример 11. Фармакокинетика слитых полипептидов у мышей

[00233] Анализ фармакокинетики слитых полипептидов, обозначенных как SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, а также SEQ ID NO: 3 и 4 для сравнения, проводили на мышах. Самцам мышей линии CD-1 возрастом примерно 5 недель (3 мыши на момент времени; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) вводили в хвостовую вену слитый полипептид в дозе 10 мг/кг. Тестируемые продукты вводили в виде однократной дозы в объеме 5 мл/кг. Образцы плазмы крови от мышей получали в моменты времени, соответствующие 5 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 4 дням, 8 дням, 14 дням и 20 дням. Достаточное количество цельной крови, взятое под анестезией с использованием изофлурана, собирали для получения по меньшей мере 100 мкл плазмы крови в пробирке Li-Heparin на животное и временную точку. Уровни лекарственного средства выявляли при помощи ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней HER2 и CD137. Уровни трастузумаба в плазме крови определяли при помощи ELISA сэндвич-типа с мишенями HER2 и Fc человека. Данные аппроксимировали с использованием двухкомпарментной модели с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 5.

[00234] На фигуре 13 показаны графические изображения концентрации в плазме крови с течением времени конструкций с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, во всех случаях нанесенной на график совместно со значениями, полученными для SEQ ID NO: 3 и 4 для сравнения. Фармакокинетика выглядят сходной во всех случаях. Начиная с концентрации в плазме крови, составляющей около 200 мкг/мл, уровни в плазме крови падали до уровня, составляющего около 50 мкг/мл, в пределах 48 часов, а затем дополнительно снижались с намного более низкой скоростью до уровня, составляющего около 25 мкг/мл, на момент окончания эксперимента через 20 дней. Биэкспоненциальный распад при двухкомпарментной модели успешно применяли для точного изображения данных, и аппроксимация данных (фигура 13, таблица 8) с использованием этой модели давала в результате периоды полувыведения в конечной фазе, составляющие 15-21 день, для биспецифических слитых полипептидов по сравнению с 13 днями для SEQ ID NO: 3 и 4.

[00235] Данные демонстрируют, что биспецифические слияния обладают продолжительным подобным антителу периодом полувыведения в конечной фазе у мышей. Поскольку анализ, применяемый для определения концентраций слитого полипептида в плазме крови, требует сохраненной активности по отношению как к HER2, так и к CD137, то из результата также видно, что биспецифические молекулы остаются интактными и активными в течение периода времени, составляющего 20 дней.

Таблица 8. Периоды полувыведения в конечной фазе у мышей, полученные с использованием аппроксимации данных на основе двухкомпарментной модели

Конструкция	Период полувыведения в конечной фазе [дни $\pm$ станд. погрешность аппроксимации]
SEQ ID NO: 3 и 4	13,3 $\pm$ 1,2
SEQ ID NO: 9 и 10	20,9 $\pm$ 3,8
SEQ ID NO: 11 и 12	19,1 $\pm$ 2,5
SEQ ID NO: 13 и 14	14,8 $\pm$ 1,5
SEQ ID NO: 15 и 16	15,6 $\pm$ 1,9

[00236] Пример 12. Фармакокинетика слитых полипептидов у яванского макака

[00237] Анализ фармакокинетики слитых полипептидов, обозначенных как SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, а также SEQ ID NO: 3 и 4 для сравнения, проводили на яванских макаках. Самцы яванских макаков получали внутривенное вливание в течение 60 минут с дозой, составляющей 3 мг/кг тестируемого продукта. Образцы плазмы крови от яванских макаков получали в моменты времени, соответствующие 15 мин, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 3 дням, 4 дням, 5 дням, 6 дням, 7 дням, 9 дням, 11 дням, 14 дням, 18 дням и 24 дням. Уровни лекарственного средства выявляли при помощи ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней HER2 и CD137. Уровни трастузумаба в плазме крови определяли при помощи ELISA сэндвич-типа с мишенями HER2 и Fc человека. Данные аппроксимировали с использованием двухкомпарментной модели с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 5.

На фигуре 14 показаны полулогарифмические графические изображения концентрации в плазме крови с течением времени конструкций с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, во всех случаях нанесенной на график совместно со значениями, полученными для SEQ ID NO: 3 и 4 для сравнения. Фармакокинетика выглядят сходной во всех случаях. Начиная с концентрации в плазме крови, составляющей около 70 мкг/мл, уровни в плазме крови падали до уровней, близких к нулю, в течение периода времени, составляющего 24 дня. Биэкспоненциальный распад при двухкомпарментной модели успешно применяли для точного изображения данных, и аппроксимация данных (фигура 14, таблица 9) с использованием этой модели давала в результате периоды полувыведения в конечной фазе, находящиеся в диапазоне от примерно 64 до 99 часов, для биспецифических слитых полипептидов по сравнению с восьмьюдесятью шестью часами для SEQ ID NO: 3 и 4.

[00238] Из данных таким образом видно, что биспецифические слияния характеризуются периодами полувыведения в конечной фазе у яванских макаков, которые очень схожи с периодом полувыведения эталонного полипептида с SEQ ID NO: 3 и 4.

Таблица 9. Периоды полувыведения в конечной фазе у яванских макаков, полученные с использованием аппроксимации данных на основе двухкомпарментной модели

Конструкция	Период полувыведения в конечной фазе [часы $\pm$ станд. погрешность аппроксимации]
SEQ ID NO: 3 и 4	86,0 $\pm$ 3,1
SEQ ID NO: 9 и 10	98,7 $\pm$ 1,5
SEQ ID NO: 11 и 12	65,2 $\pm$ 1,4
SEQ ID NO: 13 и 14	83,9 $\pm$ 3,0
SEQ ID NO: 15 и 16	63,7 $\pm$ 0,7

[00239] Пример 13. Ex vivo оценка иммуногенности слитых полипептидов в отношении Т-клеток

Для изучения риска образования антител к лекарственному средству у человека проводили in vitro оценку иммуногенности в отношении Т-клеток биспецифических слитых полипептидов с SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 15 и 16, а также SEQ ID NO: 3 и 4 для сравнения, контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 и положительного контроля, представляющего собой гемоцианин лимфы улитки (KLH). Для выполнения эксперимента РВМС от 32 доноров, выбранных

для охвата аллотипов HLA, отражающих распределение в мировой популяции, размораживали, промывали и высевали на 96-луночные планшеты с плотностью, составляющей 3×10^5 клеток на лунку. Тестируемые продукты, разведенные в средах для анализа, добавляли к клеткам в концентрации, составляющей 30 мкг/мл. Отдельно
 5 среду для анализа использовали в качестве холостой пробы, а гемоцианин лимфы улитки (KLH) использовали в качестве не подвергнутого воздействию положительного контроля. РВМС инкубировали в течение 7 дней в увлажненной атмосфере при 37°C и 5% CO₂. В день 7 РВМС метили в отношении поверхностных фенотипических маркеров
 10 CD3+ и CD4+ и в отношении включенного в ДНК EdU (5-этинил-2'-дезоксинуридина), используемого в качестве маркера клеточной пролиферации. Процентную долю пролиферирующих CD3⁺CD4⁺EdU⁺ клеток измеряли с помощью проточного цитометра Guava easyCyte 8HT и анализировали с помощью программного обеспечения GuavaSoft InCyte.

15 На фигуре 15 представлены результаты этого анализа для всех 32 доноров и всех тестируемых исследуемых молекул. На фигуре 15А на графике нанесен индекс стимуляции, который получали по соотношению пролиферации в присутствии тестируемого продукта в сравнении с пролиферацией при отсутствии тестируемого продукта. Пороговый уровень, который определяет отреагировавшего донора (индекс
 20 стимуляции >2), показан в виде пунктирной линии. На фигуре 15В на графике нанесено количество прореагировавших доноров, определенное по этому пороговому уровню. Очевидно, что количество доноров, прореагировавших на эталонный полипептид с SEQ ID NO: 3 и 4, остается на уровне одного и в связи с этим является незначительным, тогда как все 32 донора отреагировали на положительный контроль, представляющий
 25 собой KLH, с сильной пролиферацией выше порогового уровня. Для биспецифических слитых полипептидов количество прореагировавших доноров варьирует от нуля (SEQ ID NO: 9 и 10) к одному (SEQ ID NO: 15 и 16) и двум (SEQ ID NO: 13 и 14) до трех (SEQ ID NO: 11 и 12).

Из эксперимента таким образом видно, что биспецифические слитые полипептиды,
 30 в частности SEQ ID NO: 9 и 10 и SEQ ID NO: 15 и 16, индуцируют незначительный ответ при *in vitro* оценке иммуногенности в отношении Т-клеток, что указывает на то, что риск индукции иммуногенных ответов низок.

[00240] Пример 14. Ингибирование роста опухоли при помощи биспецифических средств с CD137/HER2 в гуманизированной мышинной модели опухоли

35 [00241] Для того, чтобы изучить активность SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 11 и 12, SEQ ID NO: 13 и 14 и SEQ ID NO: 32 и 33 на *in-vivo* мышинной модели, авторы настоящего изобретения использовали иммунодефицитных NOG-мышей (Taconic, NOD/Shi-scid/IL-2R^γnull), которым прививали опухоли SK-OV-3 человека и РВМС человека.

4-6-Недельным NSG-мышам подкожно (s. c.) вводили 5×10^6 клеток SK-OV-3 в растворе матригель/PBS (1:1). Опухолям предоставляли возможность вырасти до среднего
 40 размера, составляющего 120 мм³, и в день 0 эксперимента мышей рандомизировали в группы обработки согласно размеру опухоли и весу животного. Мышам вводили 7×10^6 свежих РВМС человека внутривенно (i. v.) в хвостовую вену. Мышам вводили 20 мкг или 100 мкг средства для обработки или контрольного средства во внутрибрюшинную
 45 полость через 1 час после введения РВМС в день 0 и снова в день 7 и день 14. Исследуемыми молекулами были контроль, представляющий собой изотип IgG4 (№ по кат. DDXCH04P, Acris Antibodies GmbH), биспецифические средства с HER2/CD137 с SEQ

ID NO: 9 и 10 (100 мкг или 20 мкг), SEQ ID NO: 11 и 12 (100 мкг или 20 мкг) и SEQ ID NO: 13 и 14 (100 мкг) или связывающее CD137 показателевое антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 (100 мкг). В каждой группе было 10 мышей, за исключением группы, с использованием которой исследовали SEQ ID NO: 32 и 33, в которой было 7 мышей.

5 Рост опухоли регистрировали каждые 3-4 дня.

[00242] На фигуре 16 показаны медианные размеры опухолей относительно исходного объема в день 14 исследования. Наилучших ответов, которые упорядочены по силе ингибирования роста опухоли, достигали с помощью SEQ ID NO: 9 и 10 (100 мкг), SEQ ID NO: 9 и 10 (20 мкг) и SEQ ID NO: 11 и 12 (100 мкг), тогда как SEQ ID NO: 11 и 12 при
10 более низкой дозе, составляющей 20 мкг, SEQ ID NO: 13 и 14 (100 мкг), а также связывающее CD137 показателевое антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 характеризовались медианным ответом, который был подобен таковому для контроля, представляющего собой изотип.

[00243] Пример 15. Изучение активации пути, связанного с CD137, с использованием
15 репортерных NF-κB-luc2P/4-1BB клеток Jurkat

[00244] Авторы настоящего изобретения использовали репортерный анализ с целевыми клетками для анализа способности слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10, способного связывать CD137 и HER2 одновременно, активировать путь, связанный с CD137, в зависимости от статуса HER2 целевой клетки. С этой целью авторы
20 настоящего изобретения использовали клетки NCI-N87 рака желудка, экспрессирующие HER2 на высоком уровне, которые смешивали с клетками NF-κB-luc2P/4-1BB Jurkat (Promega, CS196002), сконструированными с возможностью сверхэкспрессии CD137 и несущими репортерный ген люциферазы NF-κB. Для сравнения авторы настоящего изобретения исследовали поведение эталонных моноклональных антител к CD137 с
25 SEQ ID NO: 32 и 33 и SEQ ID NO: 34 и 35. В качестве отрицательного контроля авторы настоящего изобретения использовали моноспецифическое связывающее HER2 антитело с SEQ ID NO: 3 и 4. В качестве дополнительного контроля авторы настоящего изобретения также оценивали активацию пути, связанного с CD137, при отсутствии клеток NCI-N87 в отношении слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 и в отношении
30 моноклональных антител к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33 и SEQ ID NO: 34 и 35, а также в отношении моноспецифического связывающего HER2 антитела с SEQ ID NO: 3 и 4. И наконец, эксперимент также проводили без добавления тестируемого продукта («контроль, представляющий собой среду»). Фоновый сигнал, измеренный в присутствии лишь клеток NCI-N87, оценивали в лунках, в которые не добавляли клетки NF-κB-luc2P/
35 4-1BB Jurkat. В эксперименте клетки NCI-N87 культивировали на чашках в течение ночи. На следующий день свежеразмороженные клетки NF-κB-luc2P/4-1BB Jurkat (Promega, CS196002) инкубировали в течение шести часов на покрытой поверхности в присутствии разных концентраций слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10, эталонных антител с SEQ ID NO: 32 и 33 и SEQ ID NO: 34 и 35, контрольного антитела с SEQ ID NO: 3 и 4 или
40 при отсутствии добавленного тестируемого продукта. В качестве показателя для считывания авторы настоящего изобретения измеряли уровень люминесценции, индуцированной добавлением буфера Bio-Glo™ (Promega, G7940) к репортерным клеткам Jurkat. Эксперимент более подробно описан ниже.

[00245] Следующую процедуру проводили с использованием трех повторов для
45 каждого экспериментального условия. Плоскодонные планшеты для культур тканей использовали для нанесения 5×10^4 целевых опухолевых клеток NCI-N87 на лунку, при этом некоторые лунки оставляли без целевых раковых клеток в качестве контрольных лунок. Клеткам обеспечивали возможность прилипания в течение ночи при 37°C в

увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Целевые клетки предварительно выращивали в культуре при стандартных условиях, отделяли при помощи Accutase и повторно суспендировали в культуральной среде.

[00246] На следующий день планшеты дважды промывали с помощью PBS и в каждую лунку добавляли 50 мкл суспензии клеток NF-κB-luc2P/4-1BB Jurkat (соответствующей 1,5×10⁵ клеток) и 25 мкл SEQ ID NO: 9 и 10 в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,04 нМ до 10 нМ, эталонных антител с SEQ ID NO: 32 и 33 и SEQ ID NO: 34 и 35 в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,4 нМ до 10 нМ, отрицательного контроля, представляющего собой SEQ ID NO: 3 и 4, в концентрации, составляющей 10 нМ, или среды. Планшеты накрывали газопроницаемой уплотняющей пленкой (4titude) и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 6 часов. Затем 75 мкл буфера Bio-Glo™ (Promega, G7940) добавляли в каждую лунку, содержащую клетки (1:1 об./об.), и уровень люминесценции измеряли с помощью устройства для считывания планшетов, считывающего сигнал люминесценции (Pherastar). Анализ, количественное измерение и подбор аппроксимирующей кривой проводили с помощью программного обеспечения Graphpad Prism.

[00247] Результат репрезентативного эксперимента показан на фигуре 17. На этой фигуре нанесенные на график значения представлены в относительных единицах люминесценции (RLU). Возрастающие концентрации биспецифического слитого полипептида с SEQ ID NO: 9 и 10 (фигура 17A) индуцируют активацию пути, связанного с CD137, у репортерных клеток Jurkat в присутствии клеток NCI-N87, экспрессирующих HER2 на высоком уровне, в отличие от отрицательного контроля, представляющего собой SEQ ID NO: 3 и 4 (фигура 16A). Более того, при отсутствии целевых клеток NCI-N87 не наблюдали повышения люминесценции. Такое поведение весьма отличается как от первого антитела к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33, которое индуцирует активацию пути, связанного с CD137, в репортерных клетках Jurkat как в присутствии, так и в отсутствие клеток NCI-N87 (фигура 17B), так и от второго антитела к CD137 с SEQ ID NO: 34 и 35, которое вообще не приводит к активации пути, связанного с CD137, в репортерных клетках Jurkat (фигура 17C).

[00248] В эксперименте показано, что SEQ ID NO: 9 и 10 активирует путь, связанный с CD137, образом, который зависит от присутствия целевых клеток, экспрессирующих HER2, поскольку активация не происходит при отсутствии клеток NCI-N87. Эти данные подтверждают, что механизм действия SEQ ID NO: 9 и 10 в отношении активации Т-клеток заключается в активации пути, связанного с CD137, путем перекрестного связывания рецептора CD137 посредством взаимодействия с HER2 на раковых клетках. Специфичный в отношении положительных по HER2 клеток механизм действия далее проиллюстрирован путем сравнения с данными, полученными для антитела к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33, которое активирует Т-клетки посредством передачи сигнала CD137 независимо от присутствия или отсутствия целевых клеток.

[00249] Пример 16. Ингибирование роста опухоли при помощи биспецифических средств с CD137/HER2 в гуманизированной мышинной модели опухоли

[00250] Согласно протоколу, аналогичному протоколу из примера 14, мышам с нарушенным иммунитетом с привитыми HER2-положительными опухолевыми клетками (SKOV-3) вводили PBMC человека и обрабатывали в течение 3 недель с помощью SEQ ID NO: 9 и 10 в концентрации, составляющей 100 мкг/неделя или 20 мкг/неделя, антитела к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33, или контролей, которые представляли собой среду с PBMC («только PBMC»), среду без PBMC («без PBMC»), или контроля,

представляющего собой изотип, с РВМС. В частности, NOG-мышам подкожно (s. c.) вводили клетки SK-OV-3 и опухолям предоставляли возможность вырасти до среднего размера, составляющего 120 мм³, перед рандомизацией в группы обработки. В группе обработки было 10 животных. Мышам прививали свежие РВМС человека внутривенно (i. v.) в хвостовую вену и обработку начинали через 1 час. На протяжении 3 недель мыши получали один раз в неделю внутрибрюшинные (i. p.) дозы средства для обработки (20 мкг или 100 мкг) SEQ ID NO: 9 и 10 или SEQ ID NO: 32 и 33 или контроля. Рост опухоли регистрировали дважды в неделю. Опухоли от двух мышей собирали в день 20 после обработки и оценивали в отношении инфильтрации Т-клетками человека при помощи иммуногистохимического анализа путем окрашивания на маркер лимфоцитов человека, CD45.

[00251] Результаты эксперимента опубликованы на фигуре 18. На фигуре 18А показано медианное значение роста опухоли с течением времени. Точки измерения, которые более не представляют полноразмерную группу из 10 мышей, соединены пунктирными линиями. Наилучших ответов, которые упорядочены по силе ингибирования роста опухоли, достигали с помощью SEQ ID NO: 9 и 10 (100 мкг), после которой идет более низкая доза (20 мкг) того же антитела, тогда как связывающее CD137 показательное антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 характеризовались медианным ответом, который был подобен таковому для контроля, представляющего собой изотип. На фигуре 18В показан иммуногистохимический анализ опухолей после окончания исследования. Срезы опухолей, фиксированных с помощью формалина и залитых парафином (2 на группу), окрашивали на маркер лимфоцитов человека, CD45; встречаемость CD45-положительных клеток количественно определяли с помощью специализированного программного обеспечения, показанную на фигуре 18В. На фигуре показано, что SEQ ID NO: 9 и 10 (100 мкг) приводили в результате к повышенной степени встречаемости инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) человека, тогда как SEQ ID NO: 9 и 10 (20 мкг), а контроли не приводили к таковой.

[00252] В результатах отражено, что обработка с помощью SEQ ID NO: 9 и 10 в высокой дозе (100 мкг/неделя) и низкой дозе (20 мкг/неделя) приводила к более сильному ингибированию роста опухоли (TGI) по сравнению с контролем, представляющим собой изотип, или показательным антителом к CD137. В изображении ИHC-окрашивании на маркер лимфоцитов человека, CD45, видно повышенную степень встречаемости TIL человека для высокой дозы (100 мкг) SEQ ID NO: 9 и 10, тогда как при низкой дозе (20 мкг) SEQ ID NO: 9 и 10 не наблюдают такого эффекта. Взятые вместе эти данные согласуются с двойной функциональностью SEQ ID NO: 9 и 10: с одной стороны, ограниченное опухолью целенаправленное воздействие на CD137 приводит к распространению TIL в микроокружении опухоли и предполагает ограниченную опухолью костимуляцию активации Т-клеток с помощью SEQ ID NO: 9 и 10, тогда как ингибирование роста опухоли наблюдают при 20 мкг SEQ ID NO: 9 и 10 при отсутствии распространения TIL, что позволяет предположить, что данная активность может направляться антагонизмом HER2.

[00253] Пример 17. Фенотипирование РВМС и летальность, определенная с помощью гуманизированной NOG-мышинной модели опухоли, индуцированной SKOV-3

[00254] Для того, чтобы оценить безопасность SEQ ID NO: 9 и 10, РВМС выделяли из образцов крови мыши мышей из эксперимента 16. Эти образцы отбирали в день 19 после того, как прививали РВМС, и анализировали с помощью мультимаркерной FACS на поверхностные маркеры человека, CD45, CD3 и CD8. Периферическую кровь повторно суспендировали в 10 мл 1х буфера для лизиса эритроцитов (0,15 М NH₄Cl, 10

мМ KHCO_3 , 0,1 мМ EDTA) и лизировали в течение 1-3 минут при комнатной температуре в 15-мл пробирке. Клетки центрифугировали при $300\times g$ в течение 10 минут при 4°C , промывали 1х с помощью 10 мл FC-буфера (2% фетальной телячьей сыворотки в PBS, pH 7,4) и повторно суспендировали в 200 мкл FC-буфера. Клетки переносили в 96-луночный планшет при плотности, составляющей 5×10^5 клеток/лунка. Клетки осаждали центрифугированием планшетов при $400\times g$ в течение 3 минут при 4°C и супернатант удаляли. В каждую лунку добавляли Fc-блокирующее антитело (10 мкл/лунка, разведение 1:100 в буфере для антитела 2.4G2, 0,5 мг/мл, №553142 - BD Bioscience) и планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли специфические антитела к мишеням человека hCD45 (Life Technologies), hCD3 и hCD8 (оба от BD Bioscience) (0,5-1 мкг/образец) и планшеты инкубировали при 4°C в течение 30 минут с защитой от света. После еще одной стадии промывания (центрифугирование планшетов при $400\times g$ в течение 3 мин при 4°C) клетки повторно суспендировали в 200 мкл FC-буфера для анализа с использованием фокусирующего цитометра Attune (конструкция лазера голубой (488 нм)/фиолетовый (405 нм)). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных FlowJo.

[00255] На фигуре 19А показан CD45-, CD3- и CD8-фенотип PMBC в группах обработок и контролей из примера 16, полученный в день 19 того исследования. На фигуре 19А слева показана процентная доля всех PMBC, экспрессирующих CD45, тогда как на фигуре 19А справа показана доля эффекторных CD3+CD8+ Т-клеток в популяции CD45-положительных клеток. Совершенно очевидно из данных результатов, что обработка антителом к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33 приводит к более интенсивному распространению лимфоцитов человека в периферической крови мыши по сравнению с группой контроля или SEQ ID NO: 9 и 10, и что это распространение коррелирует с сильным повышением количества эффекторных CD8⁺ Т-клеток человека. На фигуре 19В показан уровень летальности в группах обработок и контролей из примера 16. Нанесенные на график значения фигуры 19В соответствуют количеству мышей на группу из десяти особей, которые умерли сами или нуждаются в умерщвлении, исходя из установленных общих критериев состояния. Из результатов видно, что обработка mAb к CD137 приводила к ускоренному развитию реакции трансплантат против хозяина со значимым уровнем летальности по сравнению с контролем и SEQ ID NO: 9 и 10 к концу исследования. Объединенные с данными фенотипирования PBMC результаты указывают на то, что ускоренное развитие реакции ксенотрансплантат против хозяина (xGvHD), индуцированной обработкой mAb к CD137, вызывается сильным повышенным распространением эффекторных CD8⁺ Т-клеток человека в группе с антителом к CD137 по сравнению с группами контролей или SEQ ID NO: 9 и 10.

[00256] Пример 18. Ингибирование роста опухоли при помощи биспецифических средств с CD137/HER2 в гуманизированной мышинной модели опухоли

[00257] Для того, чтобы изучить активность SEQ ID NO: 9 и 10 на in-vivo мышинной модели, авторы настоящего изобретения использовали иммунодефицитных NOG-мышей (Taconic, NOD/Shi-scid/IL-2R γ null), которым прививали опухоли SK-OV-3 человека и PBMC человека. Моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 и моноспецифическую нацеленную на HER2 конструкцию (каркас IgG4) с SEQ ID NO: 51 и 52 исследовали одновременно для оценки эффекта моноспецифического по сравнению с биспецифическим нацеливанием на рецепторы HER2 и CD137.

4-6-Недельным NSG-мышам подкожно (s. c.) вводили 5×10^6 клеток SK-OV-3 в растворе

матригель/PBS (1:1). Опухолям предоставляли возможность вырасти до среднего размера, составляющего 110 мм^3 , и в день 0 эксперимента мышей рандомизировали в группы обработки согласно размеру опухоли и весу животного. Мышам вводили 7×10^6 свежих РВМС человека внутривенно (i. v.) в хвостовую вену. Мышам вводили биспецифическое средство с HER2/CD137 с SEQ ID NO: 9 и 10 в четырех различных концентрациях (200 мкг, 100 мкг, 20 мкг или 4 мкг), контроль, представляющий собой изотип (100 мкг, № по кат. C0004, Crown Bioscience Inc., Калифорния), моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 (100 мкг) и моноспецифическое нацеленное на HER2 антитело с SEQ ID NO: 51 и 52 (80 мкг) во внутрибрюшинную полость через 1 час после введения РВМС в день 0 и снова в день 7 и день 14. Следует отметить, что дозу SEQ ID NO: 51 и 52 (80 мкг) выбирали так, чтобы она была эквивалентной таковой для группы со 100 мкг SEQ ID NO: 9 и 10. В качестве отрицательных контролей также включали группы, которым давали среду и РВМС или только среду («без РВМС»). В каждую группу входило 10 мышей, за исключением группы с SEQ ID NO: 9 и 10, которая состояла из 9 мышей, поскольку одна мышь умерла в день 4 исследования в результате причин, не связанных с обработкой. Рост опухоли регистрировали каждые 3-4 дня. Статистическую значимость ответов, представляющих собой ингибирование роста опухоли, определяли с помощью двустороннего параметрического t-критерия Стьюдента.

[00258] На фигуре 20 показан уровень летальности в исследуемых группах в день 20 после того, как привили РВМС. Летальность обусловлена реакцией ксенотрансплантат РВМС против хозяина (xGvHD), которая приводила либо к спонтанной смерти, либо к умерщвлению с этической точки зрения, исходя из заранее определенных параметров. Удивительно, но моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 приводило к резко ускоренному развитию xGvHD по сравнению со всеми другими группами, при этом ни одна мышь не выжила к концу исследования. В большинстве других групп также наблюдали летальность до окончания исследования, вплоть до трех случаев летальности в день 20. Не наблюдали явной зависимости от дозы для четырех групп обработки с помощью SEQ ID NO: 9 и 10, и уровень летальности был схож с таковым для группы с SEQ ID NO: 51 и 52 и группы «только РВМС», что свидетельствует об отсутствии влияния SEQ ID NO: 9 и 10 на возникновение xGvHD.

[00259] На фигуре 21 показаны абсолютные медианные значения размеров опухолей в зависимости от времени. Следует отметить, что значения объединяли при помощи пунктирных линий для групп, которые более не были полными по причине летальности (см. выше). Удивительно, что в группе контроля, представляющего собой изотип, имело место значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с группами контролей, которые представляли собой среды с РВМС и без них; в следующем рассмотрении релевантная группа контроля для групп обработки была выбрана таким образом, чтобы быть группой контроля, представляющего собой изотип. По сравнению с этой группой имело место сильное ингибирование роста опухоли в группе с SEQ ID NO: 9 и 10 при еженедельном введении доз, составляющих 200 мкг и 100 мкг, а также группе с SEQ ID NO: 51 и 52 в дозе, составляющей 80 мкг, при этом все ответы были схожими и статистически высоко значимыми ($p < 0,001$). SEQ ID NO: 9 и 10, вводимый еженедельно в дозе, составляющей 20 мкг, показал тенденцию в отношении ингибирования роста опухоли по сравнению с группой контроля, представляющего собой изотип, но статистическая значимость была пограничной ($p = 0,07$). Не наблюдали статистически значимого различия в день 20 между ростом опухоли в группе контроля, представляющего собой изотип, и таковым в группах либо со связывающим CD137

показательным антителом с SEQ ID NO: 32 и 33, либо с наиболее низкой дозой биспецифического средства с CD137/HER2 с SEQ ID NO: 9 и 10 (4 мкг). Взятые вместе кривые зависимости медианного роста опухоли указывают на сильную дозозависимую противоопухолевую активность SEQ ID NO: 9 и 10, которая, принимая во внимание результаты для SEQ ID NO: 51 и 52, очевидно, преимущественно обусловлена активностью SEQ ID NO: 9 и 10 в отношении HER2.

[00260] Пример 19. Фенотипирование инфильтрирующих опухоль лимфоцитов с помощью иммуногистохимического анализа в гуманизированной мышинной модели опухоли

[00261] В дополнительном анализе в отношении *in-vivo* исследования, описанного в примере 18, опухоли от пяти или шести несущих опухоли мышей из каждой из девяти исследуемых групп удаляли оперативным путем по окончании исследования или при умерщвлении по этическим причинам и оценивали в отношении инфильтрации Т-клетками человека с помощью иммуногистохимического анализа путем окрашивания на маркер лимфоцитов человека, CD45. Для этой цели опухоли фиксировали с помощью формалина, заливали парафином и подвергали иммуногистохимическому анализу с использованием антител к CD45 человека. CD45-положительные клетки идентифицировали путем окрашивания 3,3'-диаминобензидином (DAB). Для обеспечения отчетливого представления степени DAB-позитивности на изображении с градацией серого, контраст и яркость изображений корректировали в цифровой форме.

[00262] Общее представление всех окрашенных срезов опухолей представлено на фигуре 22, тогда как на фигуре 23 представлен результат цифровой количественной оценки частоты встречаемости CD45-положительных клеток с использованием специализированного программного обеспечения. На фигуре 22 показано выраженное качественное различие между группами, обработанными SEQ ID NO: 9 и 10, при введении еженедельно доз, составляющих 200 мкг, 100 мкг или 20 мкг, по сравнению со всеми другими группами. Совершенно очевидно, что DAB-позитивность в соответствующих срезах опухолей намного более интенсивная. Полное отсутствие окрашивания в группе «без РВМС» подтверждает селективность процедуры окрашивания. Цифровая количественная оценка (фигура 23) подтверждает эти качественные данные. За исключением группы с дозой, составляющей 4 мкг, по опухолям от обработанных SEQ ID NO: 9 и 10 животных видно интенсивное положительное в отношении hCD45 окрашивание, которое указывает на высокую частоту встречаемости лимфоцитов человека в срезах. Степень положительности в отношении hCD45 статистически значимо более высокая ($p < 0,01$), чем в группах контролей («только РВМС» или контроля, представляющего собой изотип) или в группах, обработанных моноспецифическим средством к HER2 с SEQ ID NO: 51 и 52 или моноспецифическим показательным антителом к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33. Примечательно, что в последней группе даже наблюдают статистически значимую более низкую степень присутствия лимфоцитов человека, чем таковая в группе контролей, например по сравнению с контролем, представляющим собой изотип ($p = 0,02$). Однако этот эффект может быть обусловлен более ранним отбором образцов, который имел место в случае с мышами из этой группы вследствие необходимого по этическим причинам умерщвления.

[00263] Из этих данных, взятых вместе, виден ограниченный опухолью приводящий к стимуляции механизм действия SEQ ID NO: 9 и 10, который приводит к увеличенной частоте встречаемости лимфоцитов человека в опухоли при еженедельном введении доз, составляющих 20 мкг или больше. Важно отметить, что эта активность строго обусловлена биспецифической активностью SEQ ID NO: 9 и 10, поскольку

моноспецифическое нацеленное на HER2 антитело с SEQ ID NO: 51 и 52 и моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 не проявляют такую активность. Напротив, моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело с SEQ ID NO: 32 и 33 приводит даже к снижению частоты встречаемости лимфоцитов человека по сравнению с отрицательными контролями.

[00264] Пример 20. Фенотипирование РВМС в гуманизированной мышинной модели опухоли

[00265] Для того, чтобы дополнительно выяснить механизм действия и оценить безопасность SEQ ID NO: 9 и 10 РВМС выделяли из образцов крови мыши мышей из эксперимента 18. Эти образцы брали из крови, полученной в результате обескровливания, на конечной стадии после умерщвления мышей в конце исследования или после умерщвления с этической точки зрения и анализировали с помощью мультимаркерной FACS на поверхностные маркеры человека, CD45 и CD8.

Периферическую кровь повторно суспендировали в 10 мл 1х буфера для лизиса эритроцитов (0,15 М NH_4Cl , 10 мМ KHCO_3 , 0,1 мМ EDTA) и лизировали в течение 1-3 минут при комнатной температуре в 15-мл пробирке. Клетки центрифугировали при 300×g в течение 10 минут при 4°C, промывали 1х с использованием 10 мл FC-буфера (2% фетальной телячьей сыворотки в PBS, pH 7,4) и повторно суспендировали в 200 мкл FC-буфера. Клетки переносили в 96-луночный планшет в плотности, составляющей 5×10^5 клеток/лунка. Клетки осаждали центрифугированием планшетов при 400×g в течение 3 минут при 4°C и супернатант удаляли. В каждую лунку добавляли Fc-блокирующее антитело (10 мкл/лунка, разведение 1:100 в буфере для антитела 2.4G2, 0,5 мг/мл, №553142 - BD Bioscience) и планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли специфические антитела к мишеням человека hCD45 (Life Technologies) и hCD8 (BD Bioscience) (0,5-1 мкг/образец) и планшеты инкубировали при 4°C в течение 30 минут с защитой от света. После еще одной стадии промывания (центрифугирование планшетов при 400×g в течение 3 минут при 4°C) клетки повторно суспендировали в 200 мкл FC-буфера для анализа с использованием фокусирующего цитометра Attune (конструкция лазера голубой (488 нм)/фиолетовый (405 нм)). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных FlowJo.

[00266] На фигуре 24 показаны CD45- и CD8-фенотип РМВМС в группах обработок и контролей из примера 20 после окончания исследования. На фигуре 24А показана процентная доля всех РМВМС, экспрессирующих CD45, тогда как на фигуре 24В показана доля эффекторных $\text{CD45}^+\text{CD8}^+$ Т-клеток в популяции CD45-положительных клеток. Совершенно очевидно из данных результатов, что обработка антителом к CD137 с SEQ ID NO: 32 и 33 приводит к более интенсивному распространению лимфоцитов человека в периферической крови мыши по сравнению с группой контроля или всеми дозами SEQ ID NO: 9 и 10, и что это распространение коррелирует с более сильным повышением количества эффекторных CD8^+ Т-клеток человека. Объединенные с данными о летальности, показанными на фигуре 20, результаты указывают на то, что ускоренное развитие xGvHD, индуцированной обработкой mAb к CD137, вызывается повышенным распространением эффекторных CD8^+ Т-клеток человека в группе с антителом к CD137 по сравнению с группами контролей или SEQ ID NO: 9 и 10.

[00267] При объединении фактических данных из примеров 18, 19 и 20 можно сделать следующие выводы.

[00268] (i) SEQ ID NO: 9 и 10 обладают двойной функциональностью: они приводят

к непосредственному регрессу опухоли вследствие направленного против HER2 действия и ограниченного опухолью повышения плотности лимфоцитов человека путем ограниченного мишенью, представляющей собой опухоль с экспрессией HER2, целенаправленного воздействия на CD137.

5 [00269] (ii) На удивление, непосредственный эффект антитела к HER2 не зависит от какой-либо опосредованной Fc-гамма рецептором эффекторной функциональности, поскольку как биспецифическое в отношении CD137/HER2 средство с SEQ ID NO: 9 и 10, так и моноспецифическое антитело к HER2 с SEQ ID NO: 51 и 52 не должны вызывать какие-либо эффекторные функции: оба имеют каркас антитела IgG4 с дополнительными

10 мутациями, которые, по сути, устраняют взаимодействия с Fc-гамма рецептором.

[00270] (iii) Преимущество биспецифического ограниченного опухолью целенаправленного воздействия на CD137 в отношении как эффективности, так и безопасности становится очевидным из сравнения с моноспецифическим нацеленным на CD137 показательным антителом: хотя биспецифическое в отношении CD137/HER2

15 средство приводит к сильному повышению уровня лимфоцитов человека в опухоли по сравнению с контролями, моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело приводит даже к снижению такового по сравнению с контролями. С другой стороны, моноспецифическое нацеленное на CD137 антитело приводит к распространению CD8-положительных Т-клеток человека в периферической крови мышей в исследовании,

20 эффект, который не был очевидным для SEQ ID NO: 9 и 10. Распространение CD8⁺ эффекторных клеток в периферической крови коррелирует с форсированной летальностью мышей в результате xGvHD. Такая токсичность, обусловленная системной активацией CD137, также может быть релевантной в отношении клинического

25 применения антитела к CD137, такого как SEQ ID NO: 32 и 33. Эти наблюдения в значительной степени гарантируют как улучшенную эффективность, так и безопасность SEQ ID NO: 9 и 10 по сравнению с моноспецифическими показательными антителами к CD137, такими как SEQ ID NO: 32 и 33.

[00271] Специалисту в данной области очевидно, что варианты *in vivo* модели, описанной в данной заявке, можно применять для демонстрации различных аспектов

30 *in vivo* эффективности SEQ ID NO: 9 и 10. Большей частью такие модели будут основаны на прививании клеток опухоли, которые являются положительными в отношении рецептора HER2 человека или его вариантов, что обеспечивается опухолевыми клетками, которые либо по природе являются положительными по HER2-рецептору, либо их

35 сделали положительными по HER2-рецептору с помощью способов, таких как трансфекция или вирусная трансдукция с помощью HER2. Такие клетки могут быть получены либо из иммортализованных линий раковых клеток, либо из опухолей пациентов. Кроме того, модели могут основываться на аллореактивности или HLA-совпадающих и реагирующих на опухоль Т-клетках, происходящих от человека или

40 мыши, как, например, указанные ниже.

[00272] (I) Гуманизированные модели, основанные на HER2-положительных опухолях и аллореактивности РВМС. Как правило, мыши, которых используют в таких моделях, будут с иммунной недостаточностью в меньшей или большей степени. Примеры модели, основанной на иммортализованной клеточной линии, представлены в данной заявке

45 и, например, в Sanmamed et al., Cancer Res. 2015 Sep 1; 75(17): 3466-78. В последней публикации также представлен пример типовой модели, основанной на полученном от пациента ксенотрансплантате опухолевых клеток.

[00273] (II) Гуманизированные модели, основанные на HER2-положительных опухолях и моноклональных или поликлональных Т-клетках, которые распознают один или

более антигенов на линии опухолевых клеток. Как правило, мыши, которых используют в таких моделях, будут с иммунной недостаточностью в меньшей или большей степени. Возможны различные комбинации специфичных в отношении опухолевой клетки Т-клеток и опухолевых клеток. Специфичные в отношении опухолевой клетки Т-клетки можно получать путем создания частично или полностью HLA-совпадающих моноклональных или поликлональных реагирующих на опухоль Т-клеток с использованием разных протоколов, например, описанных в Erskine et al., J Vis Exp. 2012 Aug 8; (66): e3683, или путем трансдукции Т-клеток природным рецептором Т-клеток, например, описанным в Wang et al., Cancer Immunol Res. 2016 Mar; 4(3): 204-14 или Hirschhorn-Cymerman et al., J Exp Med. 2012 Oct 22; 209(11): 2113-26. Для замещения природного TCR также можно использовать искусственный химерный антигенный рецептор.

[00274] (III) Полученные от пациента опухолевые клетки и аутологические полученные от пациента РВМС или (размноженные) TIL. Как правило, мыши, которых используют в таких моделях, будут с иммунной недостаточностью в меньшей или большей степени.

[00275] (IV) Трансгенная мышьяная модель, в которой рецептор CD137 частично или полностью гуманизирован, и таким образом он способен связываться с SEQ ID NO: 9 и 10. Трансгенным мышам будут прививать опухоли мышей, которым придали экспрессию HER2 человека с помощью способов клеточной биологии. Для повышения физиологической значимости модели мыши можно дополнительно придавать свойство трансгенности в отношении лиганда CD137 и/или HER2 человека.

[00276] Как ожидается, модели, описанные выше, или их варианты будут способны продемонстрировать один или более из следующих фармакодинамических эффектов: повышение частоты встречаемости TIL путем непосредственного или опосредованного усиления локальной пролиферации, повышение частоты встречаемости TIL путем непосредственного или опосредованного подавления смерти клеток-лимфоцитов, повышение активности TIL, отличной от пролиферации, или стойкости TIL, как, например, продуцирования провоспалительных цитокинов, в том числе без ограничения IL-2, IFN- γ или TNF- α , или улучшенная способность уничтожать опухолевые клетки, о чем свидетельствует сильное влияние на рост опухоли, которое не обусловлено активностью лишь SEQ ID NO: 9 и 10 против HER2. Подвергнутые воздействию лимфоциты включают без ограничения CD4- и CD8-положительные Т-клетки, NK-клетки или NKT-клетки. Другие типы клеток могут показать специфичные фармакодинамические эффекты, в том числе без ограничения эндотелиальные клетки, например эндотелиальные клетки сосудов опухоли. В случае эндотелиальных клеток опухоли целенаправленное воздействие на CD137 с помощью SEQ ID NO: 9 и 10 может повысить направленный перенос в опухоль (см. Palazon et al., Cancer Res. 2011 Feb 1; 71(3): 801-11.) посредством экспрессии нацеливающих рецепторов или растворимых факторов, усиливающих целенаправленное воздействие.

[00277] Модели можно непосредственно использовать для исследования дополнительных эффектов, таких как специфичное целенаправленное воздействие подкласса лимфоцитов, дозозависимость фармакодинамических и токсических эффектов или схемы лечения.

[00278] Варианты осуществления, иллюстративно описанные в данном документе, надлежащим образом можно осуществлять на практике в отсутствие любых элемента или элементов, ограничения или ограничений, не раскрытых конкретно в данном документе. Таким образом, например, термины «содержащий», «включающий», «состоящий из» и т.д. следует читать как открытые и неограничивающие. Дополнительно

термины и выражения, используемые в данном документе, использовали в качестве терминов описания, а не ограничения, и в использовании таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить любые эквиваленты показанных и описанных характеристик или их частей, но следует понимать, что разные модификации возможны в пределах объема заявленного изобретения. Таким образом, следует понимать, что, несмотря на то, что настоящие варианты осуществления были конкретно раскрыты с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных характеристик, к их модификации и вариациям может прибегать специалист в данной области, и что такие модификации и вариации рассматриваются как часть объема настоящего изобретения. Все патенты, патентные заявки, руководства и прошедшие рецензию публикации, описанные в данном документе, в данный документ включены с помощью ссылки в полном объеме. Кроме того, в тех случаях, когда определение или использование термина в ссылочном материале, который включен посредством ссылки в данный документ, не согласуется или противоречит определению такого термина, представленному в данном документе, тогда используют определение термина, представленное в данном документе, а определение термина из ссылки не используют. Каждое из более узких видов и субродовых группировок, находящихся в пределах родового раскрытия, также образует часть настоящего изобретения. Это включает описание настоящего изобретения в обобщенном виде с оговоркой или отрицательными признаками, удаляющими любой объект из рода, независимо от того, исключенный материал конкретно изложен в данном документе или нет. К тому же в тех случаях, когда особенности описаны в контексте групп Маркуша, специалисту в данной области будет понятно, что настоящее раскрытие также таким образом раскрыто в контексте любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша. Дополнительные варианты осуществления будут очевидны из прилагаемой формулы изобретения.

[00279] Эквиваленты. Специалисту в данной области будут понятны, или он будет способен установить с помощью всего лишь проведения обычных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе. Как предполагается, такие эквиваленты охватываются прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, таким образом включены с помощью ссылки в описание в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, отдельный патент или отдельная патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные в данном документе с помощью ссылки.

(57) Формула изобретения

1. Слитый белок, который способен к связыванию как CD137, так и Her2/neu, где слитый белок содержит по меньшей мере две субъединицы, где первая субъединица предусматривает иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен, характеризующийся специфичностью связывания в отношении HER2/neu, где иммуноглобулин выбран из группы, состоящей из трастузумаба, пертузумаба, иммуноглобулина, представленного под SEQ ID NO: 3 и 4, и моноклонального антитела, содержащего каркас IgG4, где в каркасе IgG4 необязательно имеется по меньшей мере одна из следующих мутаций: S228P, N297A, F234A и L235A;

и где вторая субъединица предусматривает мутеин липокалина со специфичностью связывания в отношении CD137, где аминокислотная последовательность мутеина липокалина предусматривает один из следующих наборов подвергнутых мутации

аминокислотных остатков по сравнению с линейной белковой последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 17):

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr; или

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu и Lys 134 → Tyr;

и где аминокислотная последовательность мутеина липокалина характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46, и

где мутеин липокалина присоединен посредством пептида к С-концу константного участка тяжелой цепи (CH) иммуноглобулина, N-концу вариабельного участка тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина и/или С-концу константного участка легкой цепи (CL) иммуноглобулина.

2. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к связыванию CD137 со значением

EC50, по меньшей мере таким же как или превосходящим значение EC50 для мутеина липокалина, специфичного в отношении CD137, включенного в слитый белок.

3. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к связыванию CD137 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или менее.

5 4. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к связыванию HER2/neu со значением EC50, сопоставимым со значением EC50 для иммуноглобулина, специфичного в отношении HER2/neu, включенного в слитый белок.

5. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к связыванию HER2/neu со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или менее.

10 6. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к одновременному связыванию CD137 и HER2/neu.

7. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен к одновременному связыванию CD137 и HER2/neu со значением EC50, составляющим приблизительно 4 нМ или менее.

15 8. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен стимулировать ответы Т-клеток в функциональном анализе активации Т-клеток.

9. Слитый белок по п. 1, где слитый белок способен индуцировать секрецию IL-2 и Т-клеточную пролиферацию в функциональном анализе активации Т-клеток.

10. Слитый белок по п. 1, где слитый белок приводит к эффективной активации Т-клеток в функциональном анализе активации Т-клеток.

20 11. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где аминокислотная последовательность мутеина липокалина характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46.

25 12. Слитый белок по любому из пп. 1-11, где аминокислотная последовательность мутеина липокалина предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39-46 или их фрагмента или варианта.

13. Слитый белок по любому из пп. 1-12, где аминокислотная последовательность мутеина липокалина предусматривает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2.

30 14. Слитый белок по любому из пп. 1-13, где первая субъединица и второй связывающий домен соединены посредством пептида между N-концом мутеина липокалина второй субъединицы и С-концом СН иммуноглобулина первой субъединицы.

35 15. Слитый белок по любому из пп. 1-14, где третья субъединица присоединена к первой субъединице посредством пептида между N-концом третьей субъединицы и С-концом CL иммуноглобулина первой субъединицы.

16. Слитый белок по любому из пп. 1-15, где пептид представляет собой неструктурированный линкер (Gly₄Ser)₃.

17. Слитый белок по любому из пп. 1-16, где слитый белок содержит аминокислоту, показанную в SEQ ID NO: 19.

40 18. Слитый белок по любому из пп. 1-17, где моноклональное антитело представляет собой трастузумаб или пертузумаб.

19. Слитый белок по любому из пп. 1-17, где моноклональное антитело содержит тяжелую и легкую цепи, представленные под SEQ ID NO: 3 и 4.

45 20. Слитый белок по любому из пп. 1-17, где моноклональное антитело содержит каркас IgG4.

21. Слитый белок по п. 20, где в каркасе IgG4 имеется по меньшей мере одна из следующих мутаций: S228P, N297A, F234A и L235A.

22. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты,

показанные в SEQ ID NO: 5 и 6.

23. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 7 и 8.

24. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 9 и 10.

25. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 11 и 12.

26. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 13 и 14.

27. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 15 и 16.

28. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп. 1-27.

29. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 28, где молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторной последовательностью для обеспечения экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

30. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 28 или 29, где молекула нуклеиновой кислоты входит в состав вектора или фагмидного вектора.

31. Клетка-хозяин для клонирования или получения слитого белка по любому из пп. 1-27, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты п. 29 или 30.

32. Способ получения слитого белка по любому из пп. 1-27, где слитый белок получают исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок.

33. Способ по п. 32, где слитый белок получают в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и выделяют из этого организма-хозяина или его культуры.

34. Фармацевтическая композиция для связывания CD137 и/или Her2/neu, содержащая эффективное количество слитого белка по любому из пп. 1-27 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Применение слитого белка по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34 для лечения HER2-положительной опухоли.

36. Применение слитого белка по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34 для одновременной активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, и воздействия на HER2/neu-положительные опухолевые клетки.

37. Способ одновременной активации нисходящих сигнальных путей, связанных с CD137, и воздействия на HER2/neu-положительные опухолевые клетки, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

38. Способ одновременной стимуляции Т-клеток и воздействия на HER2/neu-положительные опухолевые клетки, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

39. Способ одновременной индукции пролиферации Т-лимфоцитов и воздействия на HER2/neu-положительные опухолевые клетки, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

40. Способ направления образования скоплений и активации CD137 на Т-клетках в отношении HER2/neu-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

41. Способ индукции локального ответа Т-клеток в окружающем пространстве HER2/

neu-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

42. Способ индукции локального ответа NK-клеток в окружающем пространстве HER2/neu-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

43. Способ индукции продуцирования IL-2 и/или IFN-гамма Т-клетками в окружающем пространстве HER2/neu-положительных опухолевых клеток, включающий применение слитых белков по любому из пп. 1-27 или фармацевтической композиции по п. 34.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Пиерис АГ
 <120> Слитый полипептид с противораковой активностью
 <130> P1E15353PCT
 <150> EP 15166179.0
 <151> 2015-05-04
 <150> EP 15167917.2
 <151> 2015-05-18
 <150> EP 15002702.7
 <151> 2015-09-17
 <150> EP 15192870.2
 <151> 2015-11-04
 <150> EP 16150705.8
 <151> 2016-01-11
 <150> EP 16000862.9
 <151> 2016-04-15
 <160> 52
 <170> PatentIn версия 3.5

 <210> 1
 <211> 178
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный
 <220>
 <223> отрицательный контроль
 <400> 1

 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

 Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

```

<210> 2
<211> 178
<212> БЕЛЮК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина, представляющий собой положительный контроль

<400> 2

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1          5          10          15

```

3

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

<210> 3
 <211> 450
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный
 <220>
 <223> тяжелая цепь показательного антитела

4

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

5

195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 210	Lys Lys Val Glu 215	Pro Lys Ser Cys Asp 220
Lys Thr His Thr Cys Pro 225	Pro Cys Pro Ala 230	Pro Glu Leu Leu Gly Gly 235 240
Pro Ser Val Phe 245	Leu Phe Pro Pro Lys 250	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 255
Ser Arg Thr 260	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 265	Asp Val Ser His Glu 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 275	Trp Tyr Val Asp Gly 280	Val Glu Val His 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro 290	Arg Glu Glu Gln Tyr 295	Asn Ser Thr Tyr Arg 300
Val Val Ser Val Leu Thr 305	Val Leu His Gln 310	Asp Trp Leu Asn Gly Lys 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 325	Ala Leu Pro Ala Pro 330	Ile Glu 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 340	Gln Pro Arg Glu Pro 345	Gln Val Tyr 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu 355	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 360	
Thr Cys Leu Val Lys Gly 370	Phe Tyr Pro Ser Asp 375	Ile Ala Val Glu Trp 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 385	Lys Thr Thr Pro Pro Val 390	
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		

6

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 4
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> легкая цепь показателяного антитела

<400> 4

Asp Ile Gln Met 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 Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

7

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 643
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

8

50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr				
65		70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90		95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln				
	100	105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val				
	115	120		125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala				
	130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
145	150	155		160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
	165	170		175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
	180	185		190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys				
	195	200		205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
	210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly				
225	230	235		240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
	245	250		255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu				

9

260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330
		335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345
		350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
		400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410
		415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	420	425
		430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
450	455	460
Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys		

<210>	6
<211>	214
<212>	БЕЛОК
<213>	искусственный

11

<220>

<223> слитый полипептид

<400> 6

Asp Ile Gln Met 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 Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

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
 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

12

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
 210

<210> 7
 <211> 640
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

13

130		135		140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
145		150		155
				160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
	165		170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
	180		185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys				
	195		200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro				
	210		215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val				
	225		230	235
				240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr				
	245		250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu				
	260		265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys				
	275		280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser				
	290		295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys				
	305		310	315
				320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile				
	325		330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro				

14

340		345		350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	355	360		365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	370	375		380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	385	390		395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	405	410		415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	420	425		430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly	435	440		445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp	450	455		460
Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu	465	470		475
Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val	485	490		495
Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys	500	505		510
Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val	515	520		525
Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr	530	535		540
Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys				

15

545 550 555 560

Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn
565 570 575

Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg
580 585 590

Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser
595 600 605

Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro
610 615 620

Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
625 630 635 640

<210> 8
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННЫЙ

<220>
<223> СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 8

Asp Ile Gln Met 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 Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

16

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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
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
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9
<211> 640
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННЫЙ

<220>
<223> СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

17

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

18

[illegible]

19

435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp
 450 455 460
 Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu
 465 470 475 480
 Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val
 485 490 495
 Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys
 500 505 510
 Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val
 515 520 525
 Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr
 530 535 540
 Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys
 545 550 555 560
 Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn
 565 570 575
 Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg
 580 585 590
 Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser
 595 600 605
 Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro
 610 615 620
 Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
 625 630 635 640
 <210> 10

20

<211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННЫЙ

<220>
 <223> СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 10

Asp Ile Gln Met 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 Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

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
 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

21

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
210

<210> 11

<211> 447

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> слитый полипептид

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

22

115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170
		175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185
		190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
	195	200
		205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
		240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
	245	250
		255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
	260	265
		270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
	275	280
		285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
		320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		

23

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 12
<211> 407
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> слитый полипептид

<400> 12

Asp Ile Gln Met 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 Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

24

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 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
 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
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe
 245 250 255

25

His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg
260 265 270

Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys
275 280 285

Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys
290 295 300

Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 13
<211> 640
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> слитый полипептид

<400> 13

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

26

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

27

210		215		220
Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp				
225		230	235	240
Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser				
	245		250	255
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala				
	260	265		270
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr				
	275	280		285
Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly				
	290	295	300	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser				
305		310	315	320
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala				
	325		330	335
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val				
	340	345		350
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala				
	355	360		365
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val				
	370	375	380	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His				
385		390	395	400
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly				
	405	410		415
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser				

28

420 425 430
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 435 440 445
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 450 455 460
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 465 470 475 480
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 485 490 495
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 500 505 510
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 515 520 525
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 530 535 540
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 545 550 555 560
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 565 570 575
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 580 585 590
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 595 600 605
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 610 615 620
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

30

30

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15
 <211> 447
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

32

32

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 16
<211> 407
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> слитый полипептид

<400> 16

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

33

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile
 65 70 75 80
 Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
 85 90 95
 Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 180 185 190
 Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 195 200 205
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
 210 215 220
 Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 225 230 235 240

34

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
275 280 285

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210>	17
<211>	152
<212>	БЕЛОК
<213>	искусственный

<220>
<223> hNGAL дикого типа

35

<400> 17

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly Val Lys Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly
145 150

<210> 18

<211> 178 .

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> человеческий Tlc дикого типа

<400> 18

36

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

<210> 19
 <211> 15
 <212> БЕЛОК

37

<213> искусственный

<220>

<223> линкер

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 1929

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> слитый полипептид

<400> 20

```

gaagtccagc tggtcgaatc tgggtggtggc ctggtccagc ctggtggatc actgagactg      60
tcctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca      120
cctggcaagg gactggaatg ggtcgcccga atctacccta caaacggcta cactcgctac      180
gccgactccg tcaaggagcg ctttaccatc tccgccgaca cctctaaaaa caccgcctac      240
ctgcagatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga      300
ggcgacggct tttacgctat ggattactgg ggacaggaa ctctggtcac tgtgtctagc      360
gctagcaca aaggccctag tgtgtttcct ctggctccct cttccaaatc cacttctggt      420
ggcactgctg ctctgggatg cctgggtgaag gattactttc ctgaacctgt gactgtctca      480
tggaactctg gtgctctgac ttctggtgtc cacactttcc ctgctgtgct gcagtctagt      540
ggactgtact ctctgtcatc tgtggtcact gtgccctctt catctctggg aaccagacc      600
tacatttgta atgtgaacca caaaccatcc aacctaaag tggacaaaaa agtggaaacc      660
aaatcctgtg aaaaaacca cacctgccca ccttgtcctg cccctgaact gctgggagga      720
ccttctgtgt ttctgttccc accaaaacca aaagataccc tgatgatctc tagaaccct      780
gaggtgacat gtgtggtggt ggatgtgtct catgaggacc ctgaggtcaa attcaactgg      840
tacgtggatg gagtggaagt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat      900
tcaacctaca gagtggtcag tgtgctgact gtgctgcac aggattggct gaatggcaag      960

```

38

gaatacaagt gtaaagtctc aaacaaggcc ctgcctgctc caattgagaa aacaatctca 1020
 aaggccaagg gacagcctag ggaaccccag gtctacaccc tgccaccttc aagagaggaa 1080
 atgaccaaaa accaggtgtc cctgacatgc ctgggtcaaag gcttctaccc ttctgacatt 1140
 gctgtggagt gggagtcaaa tggacagcct gagaacaact acaaaacaac cccccctgtg 1200
 ctggattctg atggctcttt ctttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg 1260
 cagcagggga atgtcttttc ttgtctgtc atgcatgagg ctctgcataa ccactacact 1320
 cagaaatccc tgtctctgtc tcctggcaaa ggcggcggag gatccggggg tgggggaagc 1380
 ggcggaggag gtagccagga ctctactagt gatctgatcc cggcaccgcc actgtcaaaa 1440
 gtccctctgc aaaaaaactt tcaagacaat cagtttcacg gcaaatggta tgtggtcggc 1500
 caggccggaa acattaggct gcgggaggac aaggacccca tcaaatgat ggctaccatc 1560
 tacgagctga aggaagacaa atcttatgat gtgacaatgg tcaagttcga cgataagaaa 1620
 tgcatgtacg acatctggac cttcgtgccc ggctcccagc cgggagagtt caccctgggc 1680
 aagatcaagt ccttccccgg ccacacttcc agcctgggtc gcgtgggtctc gaccaactat 1740
 aatcagcatg ctatggtgtt cttcaagtcc gtctttcaga atagagagga gttctacatc 1800
 aactgtatg gacgcaccaaa ggagctgaca agcagagctga aagaaaactt catcagggtt 1860
 tcaaagtccc tggggctgcc cgaaaatcat atcgtgttcc cagtcccat cgaccagtgt 1920
 attgatggt 1929

<210> 21
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 21
 gacatccaga tgacacagtc tccctcttcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgagtgaca 60
 atcacctgta gggctagtca ggatgtgaat actgctgttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggaaaagccc ctaaactgct gatctactct gctcattcc tgtactctgg ggtgccttct 180
 cgattcagtg gttctagatc tggcaccgat ttcacactga ccatttcttc actgcaacct 240

39

gaggattttg ccacctacta ctgtcagcag cactacacaa cacctcccac atttggccag 300
 ggcacaaaag tggagatcaa acggaccgtg gcggcgccctt ctgtgttcat tttccccca 360
 tctgatgaac agctgaaatc tggcactgct tctgtggtct gtctgctgaa caacttctac 420
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaaagtg gacaatgctc tgcagagtgg gaattcccag 480
 gaatctgtca ctgagcagga ctctaaggat agcacatact ccctgtcctc tactctgaca 540
 ctgagcaagg ctgattacga gaaacacaaa gtgtacgcct gtgaagtcac acatcagggg 600
 ctgtctagtc ctgtgacca atccttcaat aggggagagt gc 642

<210> 22
 <211> 1920
 <212> ДНК
 <213> искусственная
 <220>
 <223> слитый полипептид

<400> 22
 gaagtccagc tggtcgaatc tgggtggtggc ctggtccagc ctggtggatc actgagactg 60
 tcctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtcgcccgat atctacccta caaacggcta cactcgctac 180
 gccgactccg tcaagggacg ctttaccatc tccgcccaga cctctaaaaa caccgcctac 240
 ctgcaaatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga 300
 ggcgacggct ttacgctat ggattactgg ggacaggga ctctgggtcac tgtctcgagc 360
 gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggcccctt gctcccggtc cacctccgag 420
 tctaccgccc ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gaccgtgagc 480
 tggaaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcaatcctcc 540
 ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660
 aaatacggcc ctccctgccc ccctgcccct gccctgaag cggcgggcgg accttccgtg 720
 tttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 780
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaggaagat ccagaggtgc agttcaactg gtatgttgac 840

40

ggcggtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcgc ctccacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgccctcc agcatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1020
 ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gccaggaaga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgacat tgccgtggaa 1140
 tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctgtga ctctcggtg acagtggata agtcccggtg gcaggaaggc 1260
 aatgtgttct cctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagtcc 1320
 ctgtccctga gcctgggcaa gggcggtgga ggatccgggg gtgggggaag cggcggaaga 1380
 ggtagccagg actctactag tgatctgac cgggcaccgc cactgtcaaa agtccctctg 1440
 caacaaaact ttcaagacaa tcagtttcac ggcaaatggt atgtgggtcg ccaggccgga 1500
 aacattagga tgcgggagga caaggacccc atcaaatga tggctaccat ctacgagctg 1560
 aaggaagaca aatcttatga tgtgacaatg gtcaagtctg acgataagaa atgcatgtac 1620
 gacatctgga ccttcgtgcc cggctcccag ccgggagagt tcaccctggg caagatcaag 1680
 tccttccccg gccacacttc cagcctggtc cgcgtggtct cgaccaacta taatcagcat 1740
 gctatggtgt tcttcaagtt cgtctttcag aatagagagg agttctacat cacactgtat 1800
 ggacgcacca aggagctgac aagcgagctg aaagaaaact tcatcagggt ttcaaagtcc 1860
 ctggggctgc ccgaaaatca tatcgtgttc ccagtcccca tcgaccagtg tattgatggt 1920

<210> 23

<211> 642

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> слитый полипептид

<400> 23

gacatccaga tgacacagtc tccctcttcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgagtgaca 60
 atcacctgta gggctagtca ggatgtgaat actgctgttg cttggtacca gcagaaacca 120
 ggaaaagccc ctaaaactgct gatctactct gccctattcc tgtactctgg ggtgccttct 180

41

cgattcagtg gttctagatc tggcaccgat ttcacactga ccatttcttc actgcaacct 240
gaggattttg ccacctacta ctgtcagcag cactacacaa cacctcccac atttggccag 300
ggcacaaaag tggagatcaa acggaccgtg gcggcgcctt ctgtgttcat tttccccca 360
tctgatgaac agctgaaatc tggcactgct tctgtggtct gtctgctgaa caacttctac 420
cctagagagg ccaaagtcca gtggaaagtg gacaatgctc tgcagagtgg gaattcccag 480
gaatctgtca ctgagcagga ctctaaggat agcacatact ccctgtctc tactctgaca 540
ctgagcaagg ctgattacga gaaacacaaa gtgtacgcct gtgaagtcac acatcagggg 600
ctgtctagtc ctgtgaccaa atccttcaat aggggagagt gc 642

<210> 24
<211> 1920
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> слитый полипептид

<400> 24
gaagtcacagc tggtcgaatc tgggtggtggc ctgggtccagc ctgggtggatc actgagactg 60
tctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca 120
cctggcaagg gactggaatg ggtcgccga atctacccta caaacggcta cactcgctac 180
gccgactcgc tcaagggacg ctttaccatc tccgccgaca cctctaaaaa caccgcctac 240
ctgcaaatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga 300
ggcgacggct tttagctat ggattactgg ggacaggga ctctggtcac tgtctcgagc 360
gctagcacca agggccctc cgtgttcccc ctggccctt gctcccggtc cacctccgag 420
tctaccgccg ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gaccgtgagc 480
tggaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcaatcctcc 540
ggcctgtact ccctgtctc cgtggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660
aaatacggcc ctccctgcc cccctgccct gccctgaag cggcggggcg accttccgtg 720
tttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 780

42

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaggaagat ccagaggtgc agttcaactg gtatgttgac 840
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa ctccacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccctc agcatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1020
 ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgccccta gccaggaaga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgacat tgccgtgga 1140
 tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctgtga ctctcgctg acagtggata agtcccgtg gcaggaaggc 1260
 aatgtgttct cctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactatac ccagaagtcc 1320
 ctgtccctga gcctgggcaa gggcggtgga ggatccgggg gtgggggaag cggcggagga 1380
 ggtagccagg actctactag tgatctgac cgggcaccgc cactgtcaaa agtccctctg 1440
 caacaaaact ttcaagaca tcagtttcac ggcaaatggt atgtggtcgg ccaggccgga 1500
 aacattaggg tcggggagga caaggacccc atcaaaatga tggctaccat ctacgagctg 1560
 aaggaagaca aatcttatga tgtgacaatg gtcaagttcg acgataagaa atgcatgtac 1620
 gacatctgga ccttcgtgcc cggctccag ccgggagagt tcaccctggg caagatcaag 1680
 tccttccccg gccacacttc cagcctggtc cgcgtggtct cgaccaacta taatcagcat 1740
 gctatggtgt tcttcaagtt cgtctttcag aatagagagg agttctacat cacactgtat 1800
 ggacgcacca aggagctgac aagcgagctg aaagaaaact tcatcagggtt ttcaaagtcc 1860
 ctggggctgc ccgaaaatca tatcgtgttc ccagtcccca tcgaccagtg tattgatgg 1920

<210> 25
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 25
 gacatccaga tgacacagtc tccctcttcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgagtgaca 60
 atcacctgta gggctagtca ggatgtgaat actgctgttg cttggtacca gcagaaacca 120

43

ggaaaagccc ctaaactgct gatctactct gcctcattcc tgtactctgg ggtgccttct 180
 cgattcagtg gttctagatc tggcaccgat ttcacactga ccatttcttc actgcaacct 240
 gaggattttg ccacctacta ctgtcagcag cactacacaa cacctccac atttggccag 300
 ggcacaaaag tggagatcaa acggaccgtg gcggcgccct ctgtgttcat tttccccca 360
 tctgatgaac agctgaaatc tggcactgct tctgtggtct gtctgctgaa caacttctac 420
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaaagtg gacaatgctc tgcagagtgg gaattcccag 480
 gaatctgtca ctgagcagga ctctaaggat agcacatact ccctgtcctc tactctgaca 540
 ctgagcaagg ctgattacga gaaacacaaa gtgtacgcct gtgaagtcac acatcagggg 600
 ctgtctagtc ctgtgaccaa atccttcaat aggggagagt gc 642

<210> 26
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 26
 gaagtccagc tggtcgaatc tgggtggtggc ctggtccagc ctggtggatc actgagactg 60
 tcctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtcgccga atctacccta caaacggcta cactcgctac 180
 gccgactccg tcaagggacg ctttaccatc tccgccgaca cctctaaaaa caccgcctac 240
 ctgcaaatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga 300
 ggcgacggct tttagctat ggattactgg ggacaggga ctctggtcac tgtctcgagc 360
 gctagacca agggccctc cgtgttccc ctggccctt gctcccggtc cacctccgag 420
 tctaccgccc ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gaccgtgagc 480
 tggaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcaatcctcc 540
 ggctgtact ccctgtcctc cgtggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660
 aaatacggcc ctccctgccc cccctgccct gccctgaag cggcgggagg accttccgtg 720

44

tttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 780
 tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaggaagat ccagaggtgc agttcaactg gtatgttgac 840
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa ctccacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgcaagggtg ccaacaaggc cctgccctcc agcatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1020
 ggcagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gccaggaaga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgacat tgccgtgga 1140
 tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttcctgta ctctcggtg acagtggata agtcccggtg gcaggaaggc 1260
 aatgtgttct cctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactatac ccagaagtcc 1320
 ctgtccctga gcctgggcaa g 1341

<210> 27
 <211> 1062
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 27
 ctgtactctg gggcgcttc tcgattcagt ggttctagat ctggcaccga tttcacactg 60
 accatttctt cactgcaacc tgaggatttt gccacctact actgtcagca gcactacaca 120
 acacctcca catttgcca gggcacaaaa gtggagatca aacggaccgt ggcggcgcct 180
 tctgtgttca ttttcccccc atctgatgaa cagctgaaat ctggcactgc ttctgtggtc 240
 tgtctgctga acaacttcta ccctagagag gccaaagtcc agtggaaagt ggacaatgct 300
 ctgcagagtg ggaattcca ggaatctgtc actgagcagg actctaagga tagcacatac 360
 tcctgtcct ctactctgac actgagcaag gctgattacg agaaacaca agtgtacgcc 420
 tgtgaagtca cacatcagg gctgtctagt cctgtgacca aatccttcaa taggggagag 480
 tgcggcggcg gaggatccg ggggtgggga agcggcgag gaggtagcca ggactctact 540
 agtgatectga tcccgccacc gccactgtca aaagtccttc tgcaacaaaa ctttcaagac 600

45

aatcagtttc acggcaaatg gtatgtggtc ggccaggccg gaaacattag gctgcgggag 660
 gacaaggacc ccatcaaaat gatggctacc atctacgagc tgaaggaaga caaatcttat 720
 gatgtgacaa tggtaagtt cgacgataag aaatgcatgt acgacatctg gaccttcgtg 780
 cccggctccc agccgggaga gttcacctg ggcaagatca agtccttccc cggccacact 840
 tccagcctgg tccgcgtggc ctcgaccaac tataatcagc atgctatggc gttcttcaag 900
 ttcgtctttc agaatagaga ggagttctac atcacactgt atggacgcac caaggagctg 960
 acaagcgagc tgaaagaaaa cttcatcagg ttttcaaagt ccctggggct gcccgaaaat 1020
 catatcgtgt tcccagtcac catcgaccag tgtattgatg gt 1062

<210> 28
 <211> 1920
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

<400> 28
 caggactcta ctatgtatct gatcccgga ccgccactgt caaaagtccc tctgcaacaa 60
 aactttcaag acaatcagtt tcacggcaaa tggatatgtg tcggccaggc cggaaacatt 120
 aggctgcggg aggacaagga ccccatcaaa atgatggcta ccatctacga gctgaaggaa 180
 gacaaatctt atgatgtgac aatggtcaag ttcgacgata agaaatgcat gtacgacatc 240
 tggaccttcg tggccggctc ccagccggga gagttcaccc tgggcaagat caagtccttc 300
 cccggccaca cttccagcct ggtccgctg gtctcgacca actataatca gcatgctatg 360
 gtgttcttca agttcgtctt tcagaataga gaggagttct acatcacact gtatggacgc 420
 accaaggagc tgacaagcga gctgaaagaa aacttcatca ggttttcaaa gtccttgggg 480
 ctgcccgaat atcatatcgt gttcccagtc cccatcgacc agtgatttga tggaggaggc 540
 ggaggatccg gcggaggagg aagtggcgga ggaggaaagt aagtccagct ggtcgaatct 600
 ggtggtggcc tgggtccagg tgggtgatca ctgagactgt cctgtgctgc ttctggtttc 660
 aacatcaagg acacctacat ccattgggtc agacaggcac ctggcaaggg actggaatgg 720
 gtcgcccga tctaccctac aaacggctac actcgctacg ccgactccgt caagggacgc 780

46

ttaccatct ccgccgacac ctctaaaaac accgcctacc tgcagatgaa tagtctgagg 840
 gccgaggata ctgctgtgta ctactgctca cgatggggag gcgacggctt ttacgctatg 900
 gattactggg gacagggaac tctggctact gtgtctagcg ctagcaccaa gggccctcc 960
 gtgttcccc tggcccttg ctcccgtcc acctccgagt ctaccgccgc tctgggctgc 1020
 ctggtgaaag actacttccc cgagcctgtg accgtgagct ggaactctgg cgcctgacc 1080
 tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg caatcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 1140
 gtggtgacag tgccctctc cagcctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 1200
 aagccctcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggaatcta aatacgccc tccctgcccc 1260
 ccctgccctg ccctgaagc ggcgggcgga ccttcctgtt ttctgttccc ccaaagccc 1320
 aaggaccccc tgatgatctc ccggaccccc gaagtgcct gcgtggtggt ggacgtgtcc 1380
 caggaagatc cagaggtgca gttcaactgg tatgttgacg gcgtggaagt gcacaacgcc 1440
 aagaccaagc ccagagagga acagttcaac tccacctacc ggggtggtgc cgtgctgacc 1500
 gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1560
 ctgccctcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggccaagg gccagccccg cgagccccag 1620
 gtgtacaccc tgccccctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1680
 ctggtgaaag gcttctaccc ctccgacatt gccgtggaat gggagtccaa cggccagccc 1740
 gagaacaact acaagaccac cccccctgtg ctggactccg acggctcctt ctctctgtac 1800
 tctcggtga cagtggataa gtcccgtgg caggaaggca atgtgttctc ctgcagcgtg 1860
 atgcacgagg ccctgcacaa ccactatacc cagaagtccc tgtccctgag cctgggcaag 1920

<210> 29

<211> 642

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> слитый полипептид

<400> 29

gacatccaga tgacacagtc tccctcttcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgagtgaca 60
 atcacctgta gggctagtca ggatgtgaat actgctgttg cttggtacca gcagaaacca 120

47

```

ggaaaagccc ctaaactgct gatctactct gcctcattcc tgtactctgg ggtgccttct 180
cgattcagtg gttctagatc tggcaccgat ttcacactga ccatttcttc actgcaacct 240
gaggattttg ccacctacta ctgtcagcag cactacacaa cacctcccac atttggccag 300
ggcacaaaag tggagatcaa acggaccgtg gcggcgccct ctgtgttcat tttcccccca 360
tctgatgaac agctgaaatc tggcactgct tctgtggtct gtctgctgaa caacttctac 420
cctagagagg ccaaagtcca gtggaaagtg gacaatgctc tgcagagtgg gaattcccag 480
gaatctgtca ctgagcagga ctctaaggat agcacatact ccctgtctc tactctgaca 540
ctgagcaagg ctgattacga gaaacacaaa gtgtacgcct gtgaagtcac acatcagggg 600
ctgtctagtc ctgtgaccaa atccttcaat aggggagagt gc 642

```

```

<210> 30
<211> 1341
<212> ДНК
<213> искусственная

```

```

<220>
<223> слитый полипептид

```

```

<400> 30
gaagtccagc tggtcgaatc tggtggtggc ctggtccagc ctggtggatc actgagactg 60
tcctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca 120
cctggcaagg gactggaatg ggtcgccga atctacccta caaacggcta cactcgctac 180
gccgactccg tcaagggacg ctttaccatc tccgccgaca cctctaaaaa caccgcctac 240
ctgcaaatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga 300
ggcgacggct tttacgctat ggattactgg ggacagggaa ctctggtcac tgtctcgagc 360
gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggcccctt gctcccggtc cacctccgag 420
tctaccgccg ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gaccgtgagc 480
tggaactctg gcgccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcaatcctcc 540
ggcctgtact ccctgtctc cgtggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660
aaatacggcc ctccctgcc cccctgccct gccctgaag cggcgggcgg accttccgtg 720

```

48

```

tttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 780
tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaggaagat ccagaggtgc agttcaactg gtatgttgac 840
ggcgtggaag tgacaaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa ctccacctac 900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgccctcc agcatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1020
ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcccccta gccaggaaga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgacat tgccgtgga 1140
tggtgagcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctgtga ctctcggctg acagtggata agtcccggtg gcaggaaggc 1260
aatgtgttct cctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagtcc 1320
ctgtccctga gcctgggcaa g

```

<210> 31
 <211> 1221
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> слитый полипептид

```

<400> 31
caggactcta ctagtgatct gatcccggca ccgccactgt caaaagtccc tctgcaacaa 60
aactttcaag acaatcagtt tcacggcaaa tggatatgtg tggccaggc cggaacatt 120
aggctgcggg aggacaagga ccccatcaaa atgatggcta ccatctacga gctgaaggaa 180
gacaaatctt atgatgtgac aatggtcaag ttcgacgata agaaatgcat gtacgacatc 240
tggaccttcg tgcccggctc ccagccggga gagttcacc tgggcaagat caagtccttc 300
cccggccaca cttccagcct ggtccgcgtg gtctcgacca actataatca gcatgctatg 360
gtgttcttca agttcgtctt tcagaataga gaggagttct acatcacact gtatggacgc 420
accaaggagc tgacaagcga gctgaaagaa aacttcatca ggttttcaaa gtccttgggg 480
ctgccgaaa atcatatcgt gttcccagtc cccatcgacc agtgtattga tggaggaggc 540
ggaggatccg gcggaggagg aagtggcgga ggaggaagtg acatccagat gacacagtct 600

```

49

```

ccctcttccc tgtccgcttc tgtgggcgat cgagtgacaa tcacctgtag ggctagtcag 660
gatgtgaata ctgctgttgc ttggtaccag cagaaaccag gaaaagcccc taaactgctg 720
atctactctg cctcattcct gtactctggg gtgccttctc gattcagtgg ttctagatct 780
ggcaccgatt tcacactgac ctttcttca ctgcaacctg aggattttgc cacctactac 840
tgtcagcagc actacacaac acctcccaca ttgggccagg gcacaaaagt ggagatcaaa 900
cggaccgtgg cggcgcttc tgtgttcatt ttcccccat ctgatgaaca gctgaaatct 960
ggcactgctt ctgtggtctg tctgctgaac aatttctacc ctagagaggc caaagtccag 1020
tggaagtgg acaatgctct gcagagtggg aattcccagg aatctgtcac tgagcaggac 1080
tctaaggata gcacatactc cctgtcctct actctgacac tgagcaaggc tgattacgag 1140
aaacacaaag tgtacgctg tgaagtcaca catcaggggc tgtctagtcc tgtgaccaa 1200
tccttcaata ggggagagtg c 1221

```

```

<210> 32
<211> 152
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 32

```

```

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1          5          10          15

```

```

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
          20          25          30

```

```

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
          35          40          45

```

```

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
          50          55          60

```

```

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65          70          75          80

```

50

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 33
<211> 152
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 33

Thr Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Arg Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

51

Asp Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 34
<211> 152
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 34

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Asn Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Arg Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

52

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 35
<211> 152
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 35

Val Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Arg Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Glu Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

53

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
 100 105 110

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 36
 <211> 152
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> мутеин липокалина

<400> 36

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
 100 105 110

54

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 37
 <211> 152
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> мутеин липокалина

<400> 37

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Glu
 35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Ala Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
 100 105 110

55

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Ser
 130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 38

<211> 152

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> мутеин липокалина

<400> 38

Thr Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Asp Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Ala Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
 100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125

56

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 39
 <211> 178
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННЫЙ

<220>
 <223> мутеин липокалина

<400> 39

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
 85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125

57

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 40

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> мутеин липокалина

<400> 40

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

58

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 41
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 41

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
65 70 75 80

59

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 42

<211> 175

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> мутеин липокалина

<400> 42

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Ser Lys Met
35 40 45

60

Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr
50 55 60

Gly Val Ser Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile Met Thr Phe
65 70 75 80

Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser
85 90 95

Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr
100 105 110

Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu
115 120 125

Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu
130 135 140

Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu
145 150 155 160

Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
165 170 175

<210> 43

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> мутеин липокалина

<400> 43

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

61

Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 44
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

<400> 44

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

62

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

His Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 45
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> мутеин липокалина

63

<400> 45

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
 85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 46

<211> 178

64

<212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННЫЙ

<220>
 <223> МУТЕИН ЛИПОКАЛИНА

<400> 46

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Ser Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Asn Tyr Ala Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
 85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

65

Asp Gly

<210> 47

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> искусственный

<220>

<223> эталонное антитело

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

66

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

67

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 48
 <211> 216
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> эталонное антитело

<400> 48

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
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

68

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 49
 <211> 442
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный
 <220>
 <223> эталонное антитело
 <400> 49

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

69

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

70

Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				245					250					255	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp
			260					265					270		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		275					280					285			
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val
	290					295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
				325					330					335	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
			340					345					350		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	370					375					380				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385					390					395					400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				405					410					415	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420					425					430		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440								

71

<210> 50
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственный

<220>
 <223> эталонное антитело

<400> 50

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

72

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 51
<211> 447
<212> БЕЛОК
<213> искусственный

<220>
<223> Трастузумаб-IgG4 S228P FALA (тяжелая цепь)

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

73

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

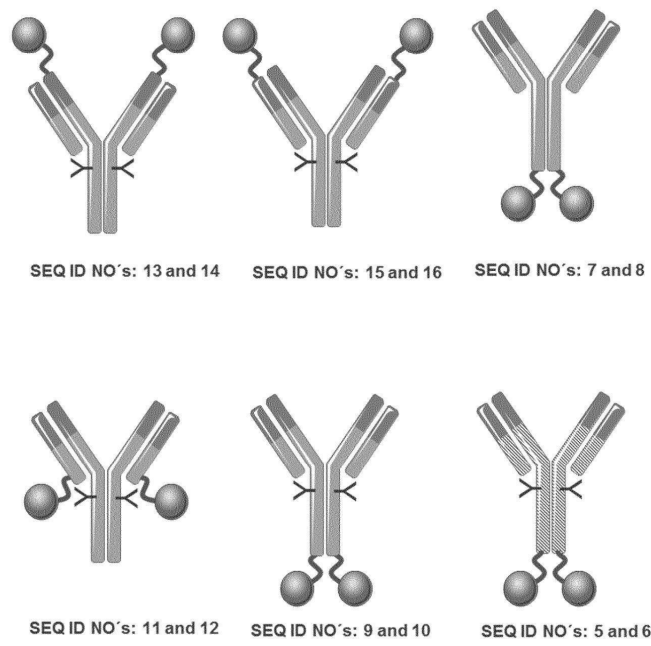
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

75

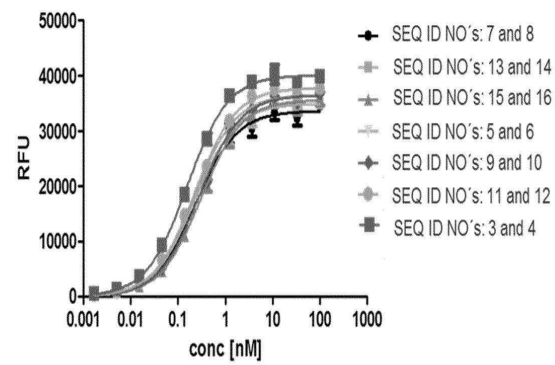
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 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
 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
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

1/23



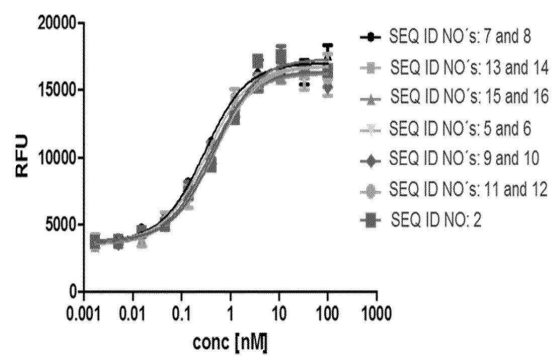
ФИГ. 1

2/23



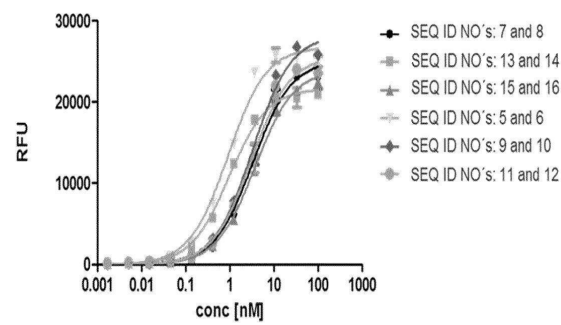
ФИГ. 2

3/23

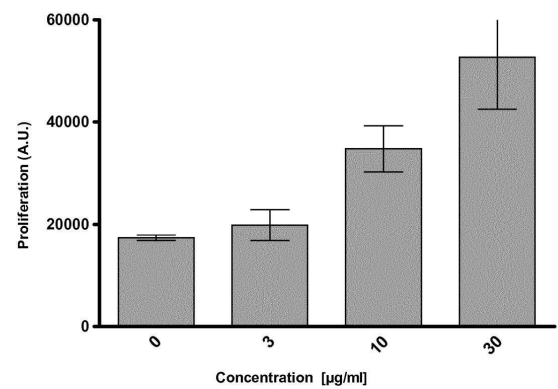


ФИГ. 3

4/23

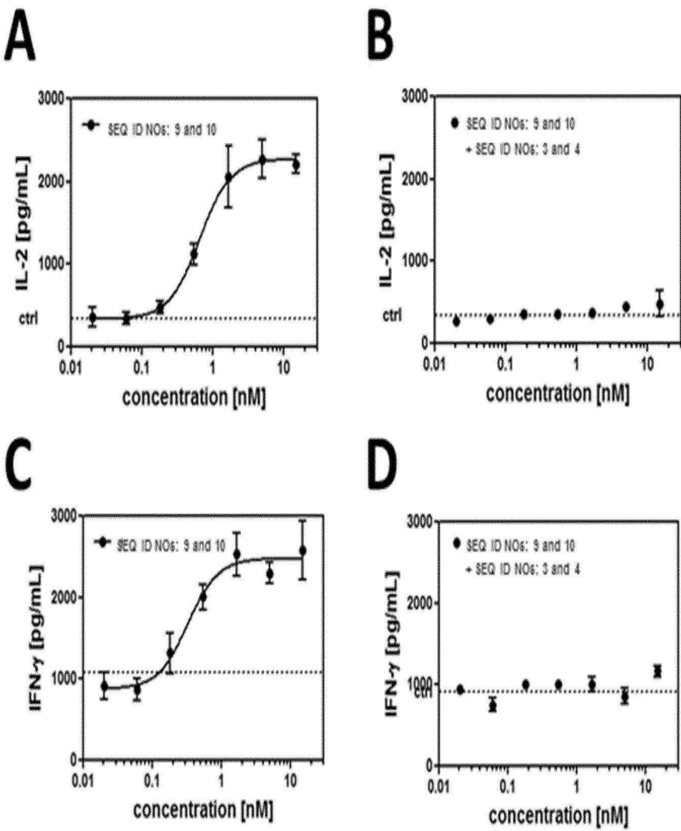


ФИГ. 4



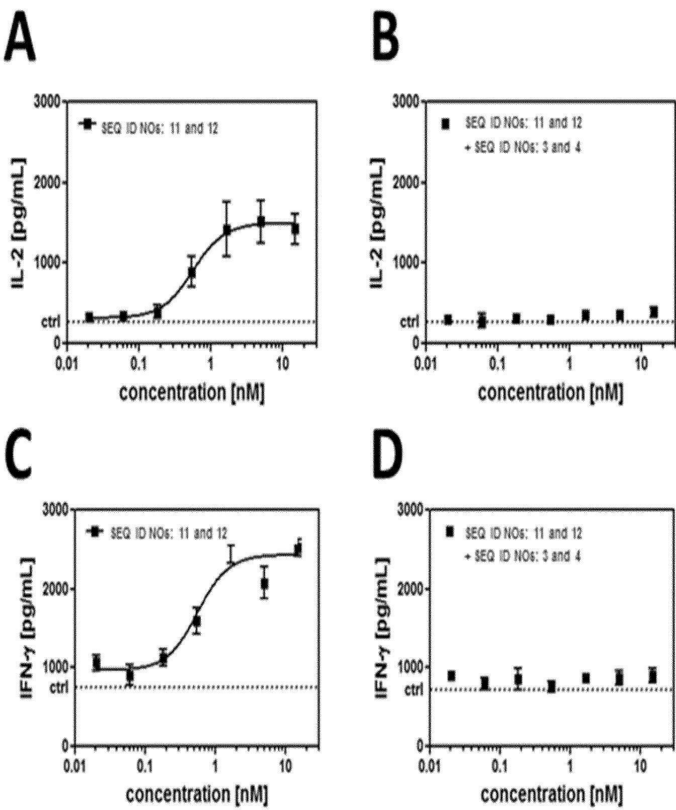
ФИГ. 5

5/23



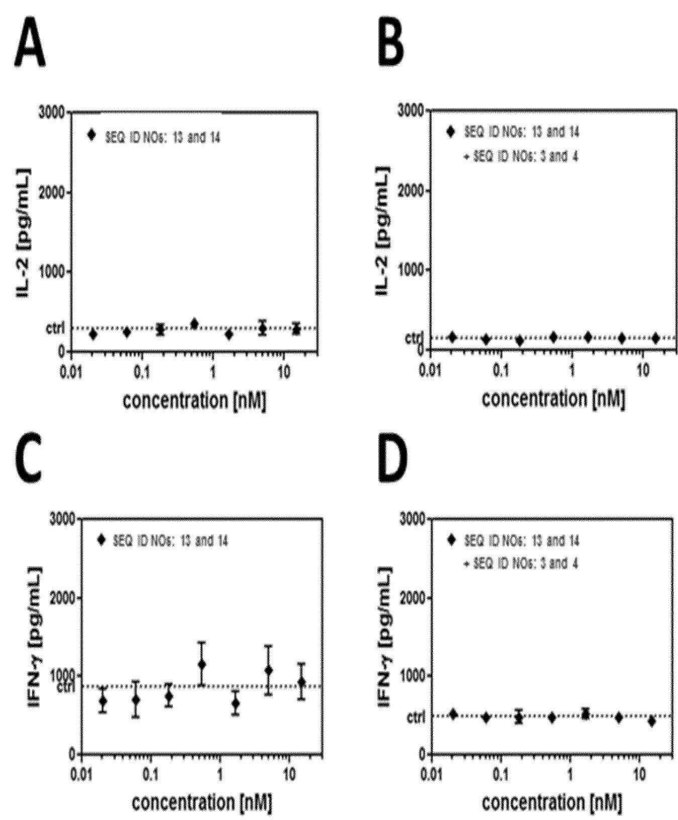
ФИГ. 6

6/23



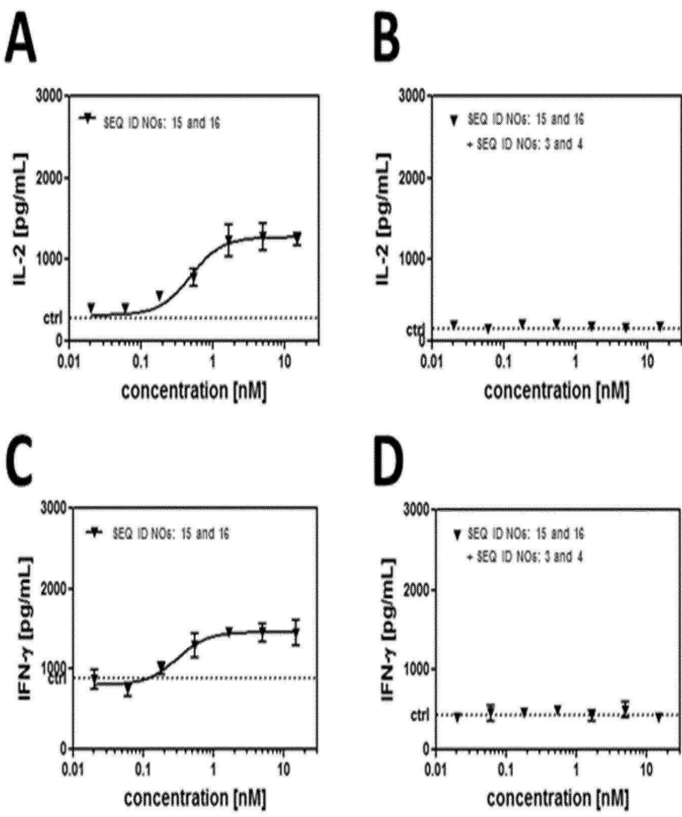
ФИГ. 7

7/23



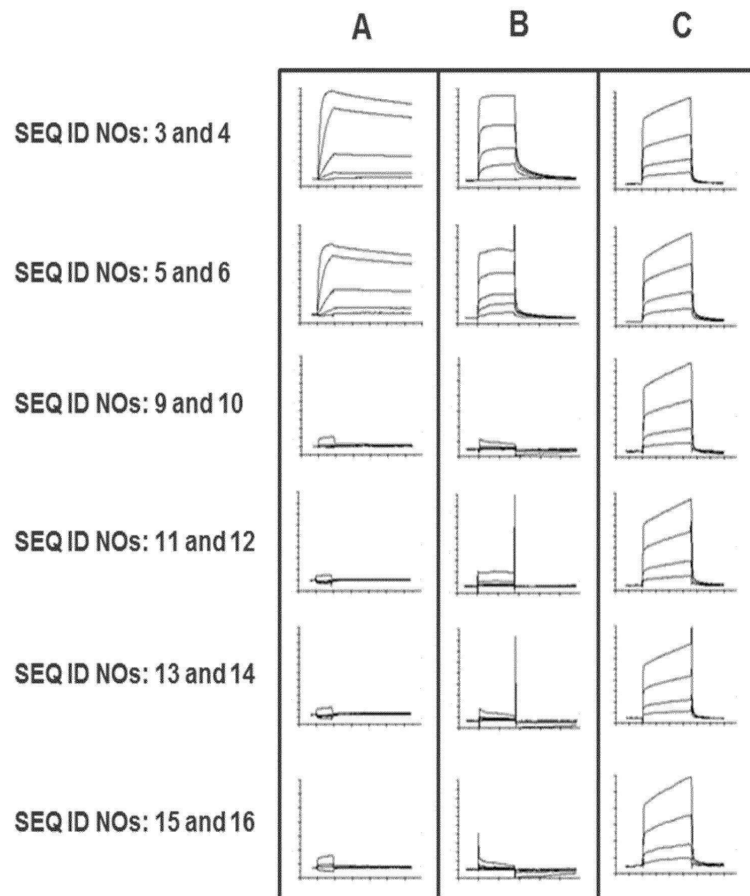
ФИГ. 8

8/23



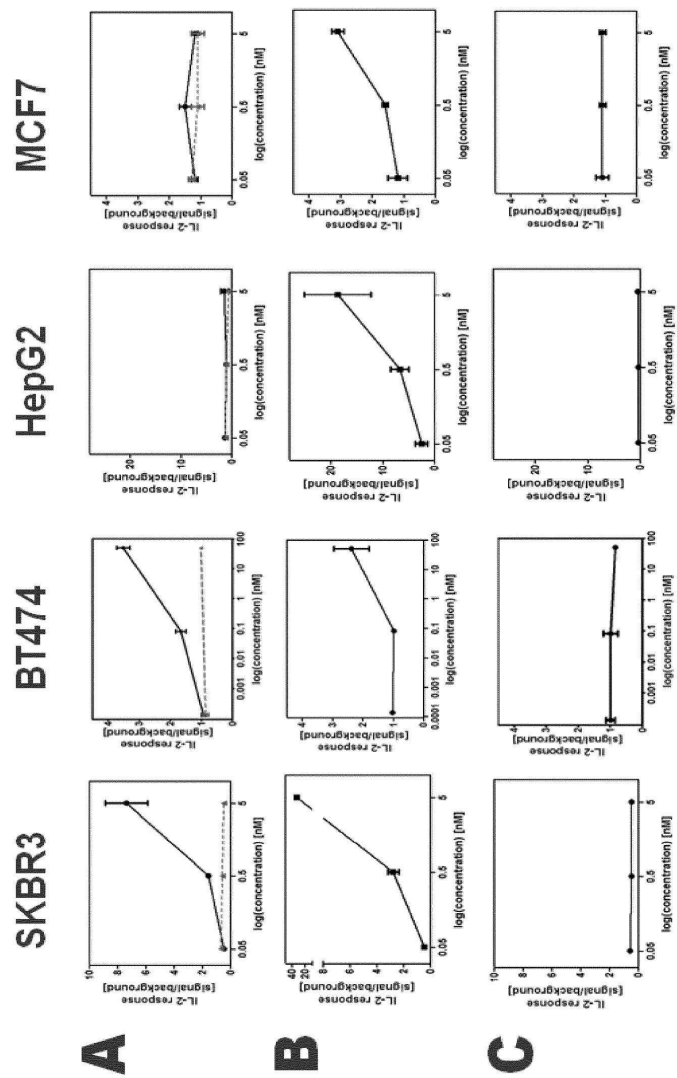
ФИГ. 9

9/23



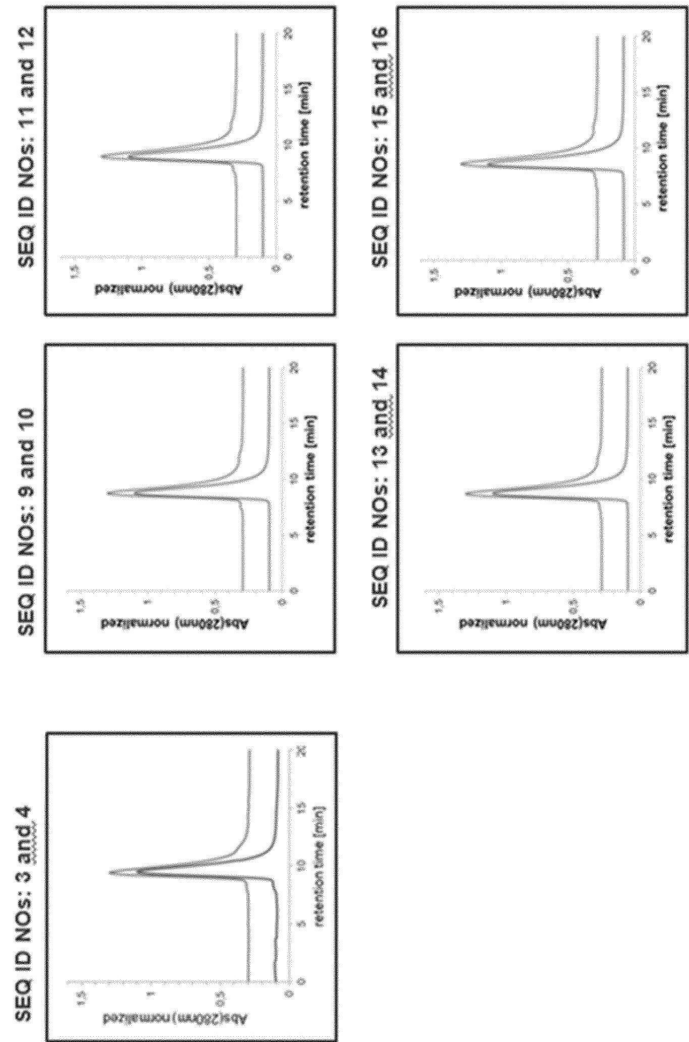
ФИГ. 10

10/23



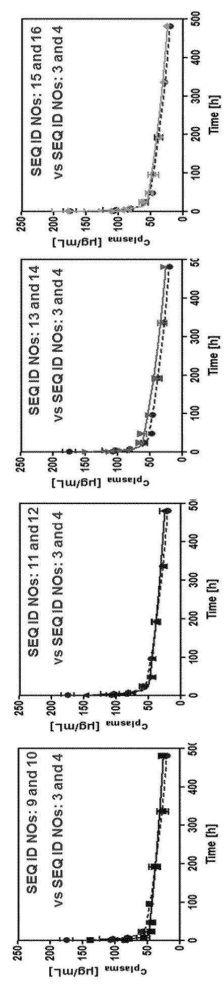
ФИГ. 11

11/23

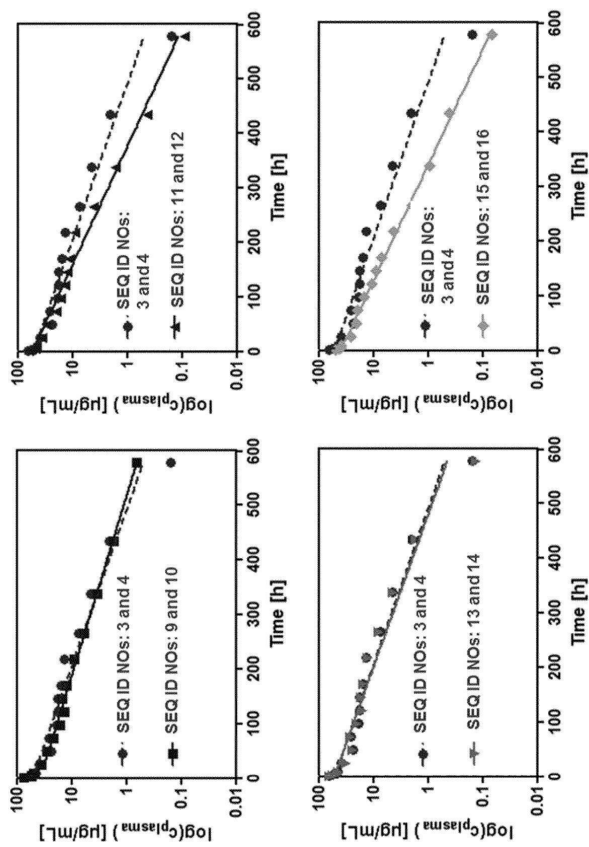


ФИГ. 12

12/23

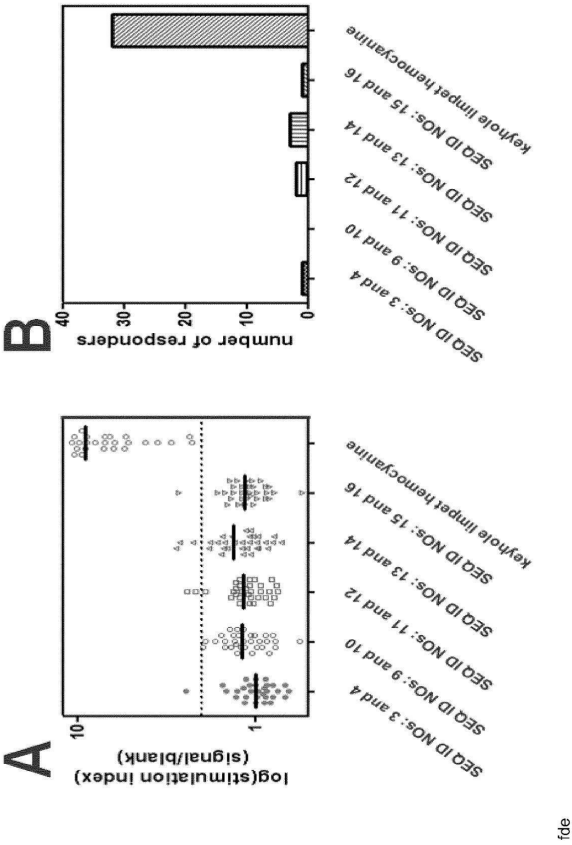


ФИГ. 13



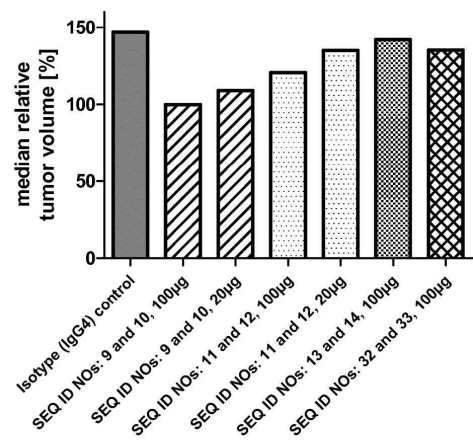
ФИГ. 14

14/23



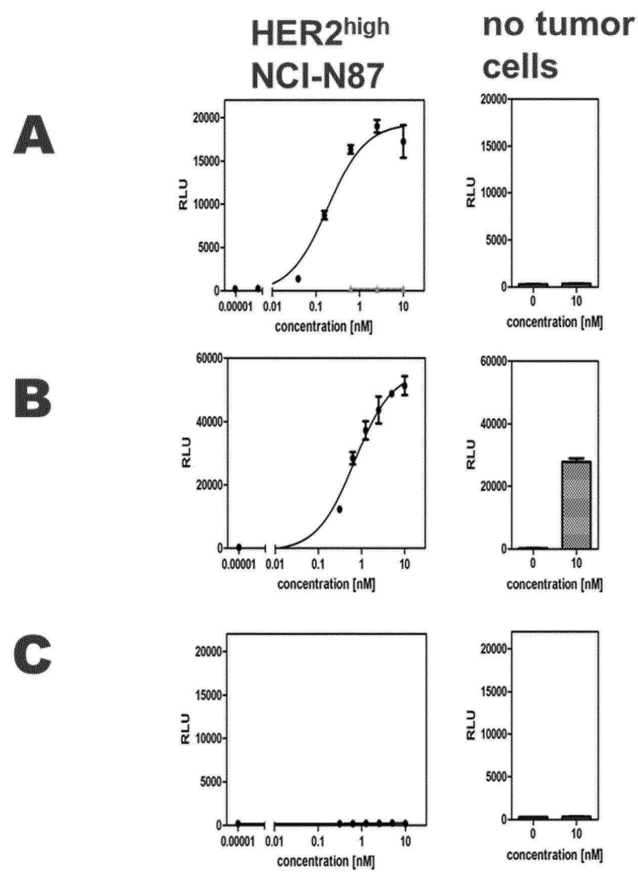
ФИГ. 15

15/23



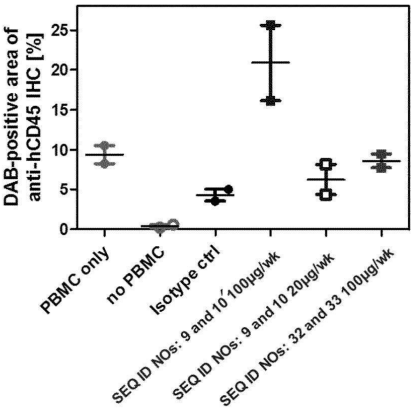
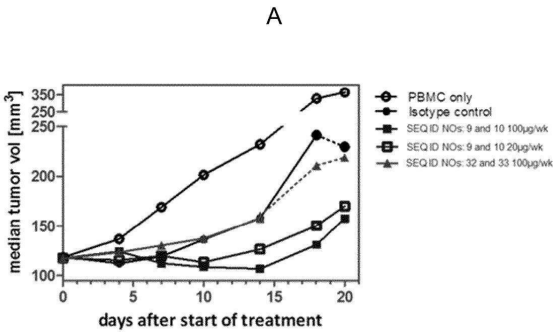
ФИГ. 16

16/23



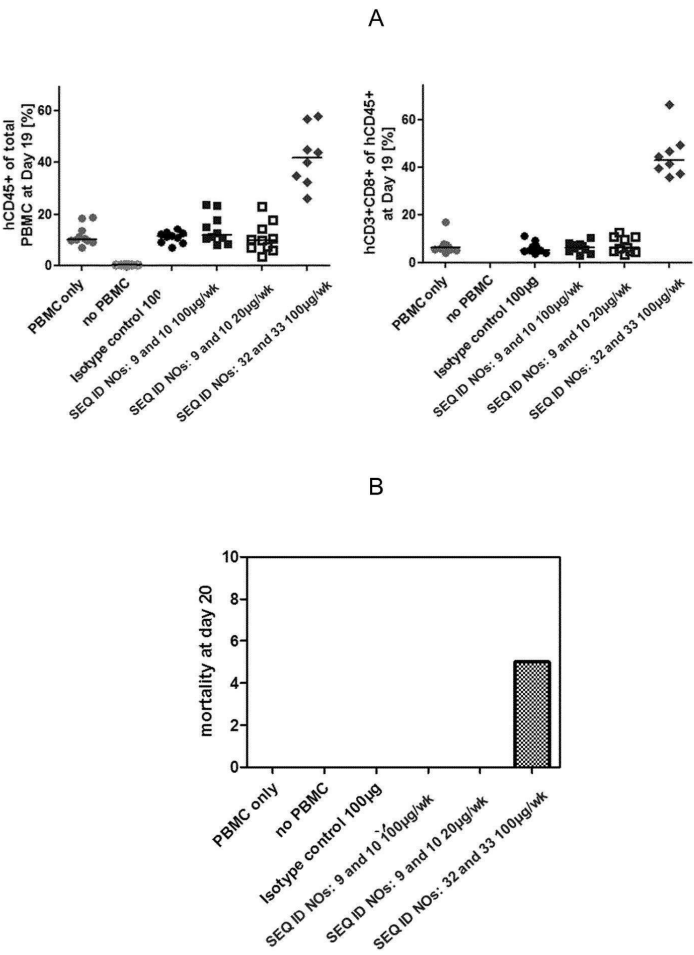
ФИГ. 17

17/23



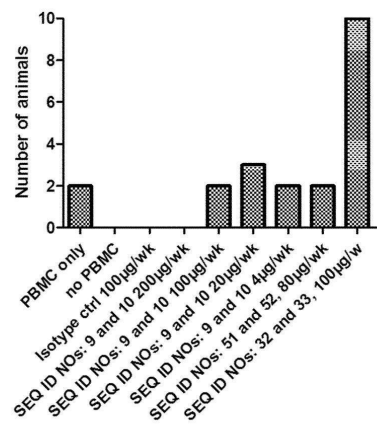
ФИГ. 18

18/23



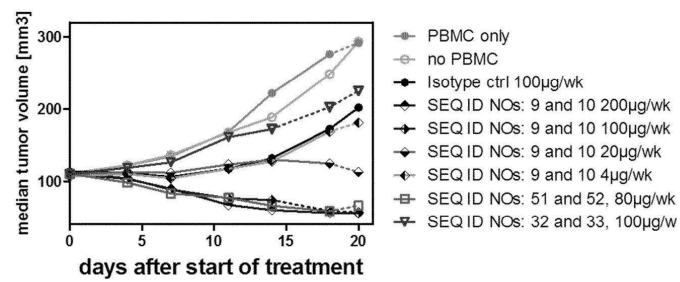
ФИГ. 19

19/23



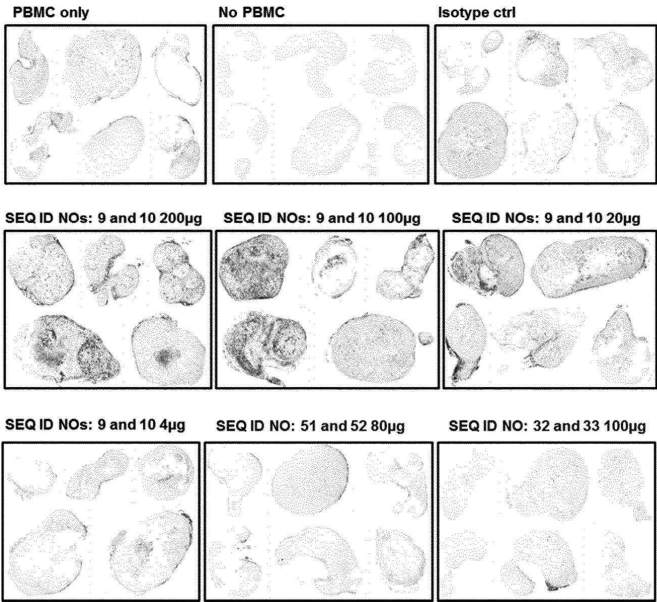
ФИГ. 20

20/23



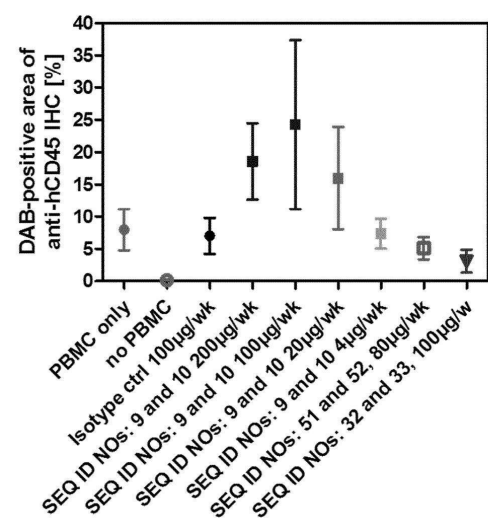
ФИГ. 21

21/23



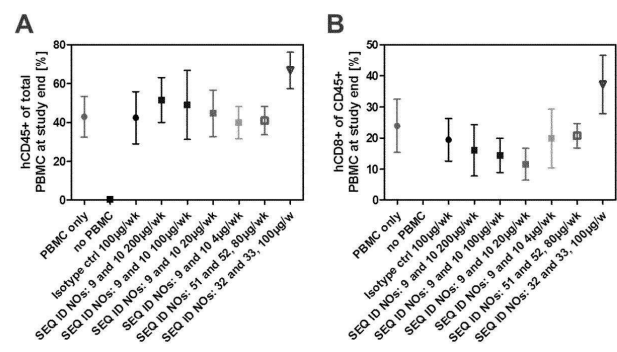
ФИГ. 22

22/23



ФИГ. 23

23/23



ФИГ. 24