



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014141598, 08.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.03.2013Дата регистрации:
03.08.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.03.2012 EP 12159938.5

(45) Опубликовано: 03.08.2017 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.10.2014(86) Заявка РСТ:
EP 2013/054768 (08.03.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/135588 (19.09.2013)Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

БРАК Симон (СН),
МУРЛАН Фредерик (СН),
ТОЛЛЕР Изабелла (СН),
ВУДС Ричард (СН),
БЕРТШИНГЕР Юлиан (СН),
ГРАБУЛОВСКИ Драган (СН),
ШАДЕ Бабетте (СН),
КЛУПШ Кристина (СН),
ХАХЕМИ Хелен (СН)(73) Патентообладатель(и):
КОВАГЕН АГ (СН)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2006007398 A1, 19.01.2006. WO
2008022759 A2, 28.02.2008. WO 2011069104
A2, 09.06.2011. RU 2361880 C2, 20.07.2009.

(54) НОВЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к биотехнологии и медицине. Предложены связывающая молекула, специфически связывающаяся с двумя различными эпитопами на HER2, и способ ее получения, а также кодирующая ее молекула нуклеиновой кислоты, экспрессирующий вектор, включающий эту молекулу нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин для экспрессии связывающей молекулы, трансформированная экспрессирующим вектором, и фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая связывающую молекулу, или молекулу нуклеиновой кислоты ее кодирующую, или экспрессирующий вектор. Предложенная связывающая молекула включает

первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:1, и второй полипептид, являющийся антителом, с тяжелой и легкой цепями, содержащими аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные SEQ ID NO:154 и SEQ ID NO:155 соответственно. Связывающая молекула эффективно подавляет рост опухолевых клеток и показывает высокую антипролиферативную активность. Предложенная группа изобретений может быть использована в медицине в противоопухолевой терапии. 6 н. и 11 з.п. ф-лы, 13 ил., 1 табл., 14 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 627 185**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2014141598, 08.03.2013**

(24) Effective date for property rights:
08.03.2013

Registration date:
03.08.2017

Priority:

(30) Convention priority:
16.03.2012 EP 12159938.5

(45) Date of publication: **03.08.2017** Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **16.10.2014**

(86) PCT application:
EP 2013/054768 (08.03.2013)

(87) PCT publication:
WO 2013/135588 (19.09.2013)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**BRAK Simon (CH),
MURLAN Frederik (CH),
TOLLER Izabella (CH),
VUDS Richard (CH),
BERTSHINGER Yulian (CH),
GRABULOVSKI Dragan (CH),
SHADE Babette (CH),
KLUPSH Kristina (CH),
KHAKHEMI Khelen (CH)**

(73) Proprietor(s):

KOVAGEN AG (CH)

(54) **NEW BINDING MOLECULES WITH ANTI-TUMOUR ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: binding molecule specifically binding to two different epitopes on HER2 and a method for its preparation, as well as a nucleic acid encoding it, expressing a vector comprising this nucleic acid molecule, a host cell for expression of a binding molecule transformed with the expression vector, and a pharmaceutical composition for cancer treatment comprising a binding molecule or a nucleic acid molecule encoding it, or an expression vector, are proposed. The proposed binding molecule comprises

the first polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:1, and the second heavy and light chain antibody polypeptide comprising amino acid sequences at least 95% identical to SEQ ID NO:NO:154 and SEQ ID NO:155, respectively. The presented group of inventions is applicable in medicine for anti-tumour therapy.

EFFECT: binding molecule effectively suppresses the tumour cells growth and shows high antiproliferative activity.

17 cl, 13 dwg, 1 tbl, 14 ex

Настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которая специфически связывается с двумя различными эпитопами антигена, экспрессированного на опухолевых клетках, при этом связывающая молекула включает (а) первый связывающий (поли)пептид, который специфически связывается с первым эпитопом указанного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках, при этом указанный первый связывающий (поли)пептид представляет собой полипептид, образованный из Fyn SH3; и (б) второй связывающий (поли)пептид, который специфически связывается со вторым эпитопом указанного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках. Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающую молекулу по изобретению, вектору, включающему указанную молекулу нуклеиновой кислоты, а также клетке-хозяину или хозяину, не являющемуся человеком, трансформированному указанным вектором. Изобретение также относится к способу получения связывающей молекулы по изобретению, а также к фармацевтической и диагностической композиции. Кроме того, настоящее изобретение также относится к связывающей молекуле, молекуле нуклеиновой кислоты, вектору или клетке-хозяину по изобретению для применения при лечении опухолей.

В данном описании цитируется ряд документов, в том числе, заявки на патент и руководства изготовителей. Указанные документы, хотя и не рассматриваются как относящиеся к патентоспособности данного изобретения, включены в данное описание в качестве ссылок. Конкретнее, все цитированные документы включены в качестве ссылок в такой же степени, как если бы каждый отдельный документ специфически и отдельно включался в качестве ссылки.

Связывающие реагенты, происходящие не от иммуноглобулинов (все вместе называемые «каркасами»; см., например, Skerra (2000), *J. Mol. Recognit*, 13, 167-187), предполагаются для применения в качестве диагностических и терапевтических средств. Свыше 50 различных белковых каркасов предложено за последние 10-15 лет, причем наиболее продвинутыми подходами в этой области (как суммировано в работе Gebauer and Skerra (2009), *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 13: 245-255) являются аффитела (на основе Z-домена стафилококкового белка A), домены типа Kunitz, аднектины (на основе 10-го домена фибронектина человека), антикалины (образованные из липокалинов), DARPins (образованные из белков анкиринового повтора), авимеры (основанные на полимеризованном LDLR-A) и фиомеры, которые образованы от человеческого домена Fyn SH3.

Вообще, домен SH3 присутствует в самых разных белках, участвующих в клеточной передаче сигналов (Musacchio et al. (1994), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 61, 283-297). Такие домены не занимают фиксированное положение в белках и могут быть экспрессированы и очищены независимо. В настоящее время известно более 1000 появлений домена, в том числе, примерно 300 доменов SH3 человека (Musacchio (2003), *Advances in Protein Chemistry*, 61, 211-268). Хотя существует большое разнообразие последовательностей доменов SH3, их всех объединяет консервативная складка: компактный бета-бочонок, образованный двумя антипараллельными бета-листами (Musacchio (2003), *Advances in Protein Chemistry*, 61, 211-268). Типично домены SH3 связываются с богатыми пролином пептидами, содержащими связывающий лейтмотив PXXP (Ren et al. (1993), *Science*, 259, 1157-1161), но также описаны примеры необычных сайтов связывания SH3 (Karkkainen et al. (2006), *EMBO Rep.*, 7, 186-191). Большинство доменов SH3, секвенированных до сих пор, имеют общую длину приблизительно в 60-65 аминокислот, но некоторые из них могут, в отличие, иметь 85 аминокислот из-за вставок в петли, соединяющие основные консервативные элементы вторичной структуры (Koyata et al. (1993), *Cell* 72

(6), 945-952). Выравнивание различных доменов SH3 выявляет консервативные аминокислотные остатки, ответственные за правильное формирование структуры, а также за узнавание канонического богатого пролином мотива (Larson et al. (2000), *Protein Science*, 9, 2170-2180).

5 Лечение опухолей обычными химиотерапевтическими средствами опирается на ожидание того, что лекарственные средства будут преимущественно убивать быстро
 10 делящиеся опухолевые клетки, а не здоровые клетки. Однако отсутствие селективности в отношении опухолевых клеток ведет к токсичности для здоровых тканей с
 увеличенными скоростями пролиферации, таких как костный мозг, желудочно-кишечный
 15 тракт и волосяные фолликулы. Химиотерапевтические средства показывают плохое накопление в массе опухоли вследствие плохой перфузии крови, неравномерной
 сосудистой сети и высокого интерстициального давления в окружающей среде опухоли (Bosslet et al. (1998), *Cancer Res.*, 58: 1195-1201). Более того, белки с множественной
 20 лекарственной устойчивостью могут снижать усвоение лекарственного средства (Ramachandran et al. (1999), *Mol. Diagn.*, 4: 81-94). Как следствие, разработка
 терапевтических средств, нацеленных преимущественно на опухолевые клетки, представляет собой основное средоточие современных противораковых исследований. В таком контексте направленная доставка терапевтических средств в место нахождения
 25 опухоли путем связывания с опухольассоциированными антигенами является развивающейся областью в современных противораковых исследованиях, которая
 сулит концентрацию биоактивных молекул в неопластических повреждениях, сберегая в то же время здоровые ткани (Pfaffen et al. (2010), *Exp. Cell Res.*, 316(5), 836-847).
 Например, при раке молочной железы и яичников наблюдается положительная регуляция белка HER2, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом (Slamon et al.
 30 (1987), *Science*, 235: 177-182; Slamon et al. (1989), *Science*, 244: 707-712). При ряде других типов опухолей, включая карциномы мочевого пузыря, слюнных желез, эндометрия, поджелудочной железы, щитовидной железы, почек, легких, верхнего отдела желудочно-кишечного тракта и толстой кишки, также наблюдают сверхэкспрессию HER2 (часто,
 35 но не постоянно, из-за амплификации гена) (Scholl et al. (2001), *Ann. Oncol.*, 12 Suppl. 1: S81-87; Ross J.S. (2011), *Biomark Med.*, 3: 307-318; Fukushige et al. (1986), *Mol. Cell Biol.*, 3: 955-958; Cohen et al. (1989), *Oncogene*, 1: 81-88; Weiner et al. (1990), *Cancer Res.*, 50: 421-425; Park et al. (1989), *Cancer Res.*, 23: 6605-6609; Zhau et al. (1990), *Mol. Carcinog.*, 5: 254-257; Aasland et al. (1988), *Br. J. Cancer*, 4: 358-363; Seliger et al. (2000), *Int. J. Cancer*, 87(3): 349-359). Кроме того, обнаружено, что HER2 сверхэкспрессируется при раке
 40 предстательной железы, хотя на меньших уровнях по сравнению с тканями молочной железы (Minner et al. (2010), *Clin. Cancer Res.*, 16(5): 1553-1560).

Ранее описаны некоторые HER2-связывающие белки, такие как аффитела и DARPins (Wikman et al. (2004), *Protein Eng. Des. Sel.*, 17(5): 455-462; Zahnd et al. (2007), 369(4): 1015-1028). Кроме того, Hudziak с сотр. описывают создание панели мышинных анти-HER2
 45 антител (включающей антитела 4D5 и 2C4), которые охарактеризованы с использованием клеточной опухолевой линии рака молочной железы человека (Hudziak et al. (1989), *Mol. Cell Biol.*, 9(3): 1165-1172; см. также патент США №5677171).
 Определялась относительная клеточная пролиферация клеток после воздействия антител. Авторы показывают, что антитела 4D5 ингибируют клеточную пролиферацию наиболее
 50 эффективно. Рекомбинантная гуманизованная версия мышинных анти-HER2 антител 4D5 (huMAb4D5-8, трастузумаб, герцептин, см. также патент США №5821337) одобрена
 Управлением по пищевым продуктам и лекарственным средствам США в 1998 для лечения HER2-положительного метастазирующего рака молочной железы (МБС) в

комбинации с химиотерапией. В настоящее время трастузумаб рекомендуется как первоочередное лечение для пациентов с метастазирующими HER2-положительными опухолями или как единственное средство (ограниченная группа пациентов) или в комбинации с эндокринной терапией или химиотерапией, а также во вспомогательном фоне (Awada et al. (2012), *Cancer Treat. Rev.*, 106(1): 6-13). Однако во время лечения трастузумабом часто встречается первичная (присущая) или вторичная (приобретенная во время лечения) устойчивость (Tsang et al. (2012), *Br. J. Cancer*, 106: 6-13). Например, наблюдали, что степень первичной устойчивости к единственному средству трастузумабу в случае сверхэкспрессирующего HER2 метастазирующего рака молочной железы составляет 66-89%. Кроме того, у большинства пациентов, у которых достигалась начальная реакция на схемы лечения на основе трастузумаба, устойчивость развивается в пределах 1 года (Nahta et al. (2006), *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3(5): 269-280). В литературе описано несколько стратегий для преодоления устойчивости к лечению трастузумабом (см. обзоры Tsang et al. (2012), *Br. J. Cancer*, 106: 6-13; Awada et al. (2012), *Cancer Treat. Rev.*, 106(1): 6-13).

Одно привлекательное направление для преодоления устойчивости представляет собой использование комбинаций HER2-связывающих средств. В таком контексте несколько групп показывают, что комбинация двух анти-HER2 антител подавляет рост клеточных опухолевых линий человека *in vitro* и/или *in vivo* лучше, чем лечение только одним антителом (Yamashita-Kashima et al. (2011), *Clin. Cancer Res.*, 17(15): 5060-5070; Scheuer et al. (2009), *Cancer Res.*, 69(24): 9330-9336; Lee-Hoeflich et al. (2008), *Cancer Res.*, 68(14): 5878-5887; Kasprzyk et al. (1992), *Cancer Res.*, 52: 2771-2776; Ben-Kasus et al. (2009), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(9): 3294-3299). Примечательно, что повышенную эффективность наблюдают при предклинических исследованиях, когда трастузумаб объединяют с пертузумабом (пертузумаб представляет собой гуманизированную форму мышинового антитела 2C4, описанную Hudziak et al. (Hudziak et al. (1989), *Mol. Cell Biol.*, 9(3): 1165-1172; патент США №5677171); Adams C.W. et al. (2006), *Cancer Immunol. Immunother.*, 55: 717-727; WO 2001/00245)), и клинические испытания фазы 2 показывают, что совместное введение трастузумаба и пертузумаба вызывает противоопухолевые реакции у пациентов, которые имели предварительно установленное развитие заболевания, пока получали терапию на основе трастузумаба (Baselga et al. (2010), *J. Clin. Oncol.*, 28: 1138-1144). Пертузумаб связывается с доменом II внеклеточной части HER2, в то время как трастузумаб связывается с сайтом в домене IV HER2, который является ближайшим к мембране. Показано, что пертузумаб из-за его специфичности связывания предотвращает образование активных гетеродимеров HER2 с другими рецепторами HER (такими как HER1, HER3 и HER4) (Agus et al. (2002), *Cancer Cell*, 2: 127-137; Fendly et al. (1990), *Cancer Res.*, 50(5): 1550-1558).

Недавно в клиническом исследовании фазе III показано, что комбинация пертузумаб плюс трастузумаб плюс доцетаксел по сравнению с плацебо плюс трастузумаб плюс доцетаксел существенно пролонгирует выживание без развития, когда используется как первоочередное лечение для пациентов с HER2-положительным метастазирующим раком молочной железы (Baselga et al. (2012), *N. Engl. J. Med.*, 366(2): 109-119). Однако среднее независимо оцененное выживание без развития пролонгируется только на 6,1 месяцев (из 12,4 месяцев в контрольной группе до 18,5 месяцев в группе пертузумаба). Кроме того, комбинация двух или большего числа биологических соединений делает необходимой дозировку двух молекул, что обычно делает регулирование и клинические процедуры более трудными. Кроме того, различия в фармакокинетике и концентрации в тканях могут снизить эффективность двух антител.

На основании улучшенной терапевтической эффективности комбинаций антител, имеющих целью различные эпитопы на HER2 или EGFR (HER1) (Perera et al. (2005), Clin. Cancer Res., 11: 6390-6399), были предприняты усилия для конструирования полиспецифических белков, имеющих целью EGFR и HER2, которые связываются с различными эпитопами или EGFR (WO 2011/020033) или HER2 (устная презентация Woioetschlager M., Bispecific Antibody Summit 2011, September 27, 2011, Boston, USA; слайды №№5 и 15).

В WO 2011/020033 EGFR-связывающие белки на основе домена фибронектина выделили и слили с С- или N-концом или тяжелой и/или легкой цепи моноклонального анти-EGFR антитела 225 (также известного как цетуксимаб (эрбитукс®)). Показано, что EGFR-связывающие домены фибронектина узнают эпитопы иные, чем антитело 225. Обнаружено, что некоторые из полученных гибридов фибронектин-антитело индуцируют образование кластеров EGFR, и отрицательная регуляция более эффективна, чем самого антитела 225.

В презентации Woioetschlager M. (устная презентация Woioetschlager M., Bispecific Antibody Summit 2011, September 27, 2011, Boston, USA; слайды №№5 и 15) описывается биспецифическое антитело на основе трастузумаба, имеющее целью HER2, трастузумаб-HER2-1, связывающееся с двумя различными эпитопами на HER2. Однако усиленной активности биспецифического антитела на основе трастузумаба по сравнению с немодифицированным трастузумабом не наблюдают.

Таким образом, несмотря на тот факт, что много усилий вложено в улучшение противопухолых терапий, все еще требуется идентификация новых терапевтических соединений для улучшенного лечения рака, которые преодолевают вышеописанные недостатки.

К такой потребности обращены положения воплощений, охарактеризованные в формуле изобретения.

Соответственно, настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которая специфически связывается с двумя различными эпитопами антигена, экспрессированного на опухолевых клетках, при этом связывающая молекула включает (а) первый связывающий (поли)пептид, который специфически связывается с первым эпитопом указанного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках, при этом указанный первый связывающий (поли)пептид представляет собой полипептид, образованный из Fyn SH3; и (b) второй связывающий (поли)пептид, который специфически связывается со вторым эпитопом указанного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках.

Термин «связывающая молекула, которая специфически связывается с двумя различными эпитопами на антигене» относится к связывающей молекуле с двумя специфичностями связывания для одного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках. Иными словами, связывающая молекула по настоящему изобретению способна специфически связываться с двумя различными сайтами связывания (т.е., эпитопами) в указанном одном антигене. Более того, биспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению способна связываться с указанными двумя различными эпитопами в одно и то же время.

Согласно настоящему изобретению считается, что молекула связывается специфически (что также в данном случае называется «взаимодействует специфически»), когда соответствующая молекула, по существу, не реагирует перекрестно с эпитопом подобной структуры. Перекрестную реактивность панели молекул при исследовании можно проверить, например, путем оценки связывания указанной панели молекул в обычных условиях с эпитопом, представляющим интерес, а также с рядом более или менее

(структурно и/или функционально) близких родственных эпитопов. Только те молекулы, которые связываются с эпитопом, представляющим интерес, в его релевантном контексте (например, специфический мотив в структуре белка), но по существу не связываются с каким-либо другим эпитопом, считаются специфическими для эпитопа, представляющего интерес. Соответствующие способы описаны, например, в Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; или в Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Термин «молекула, которая по существу не реагирует перекрестно с эпитопом подобной структуры», используемый в данном описании, относится к молекуле, которая связывается с антигеном-мишенью с аффинностью, по меньшей мере, в 5 раз большей, чем с эпитопом подобной структуры, предпочтительнее, с аффинностью, по меньшей мере, в 10 раз большей, такой как, например, в 50 раз более высокая аффинность, предпочтительнее, с аффинностью, по меньшей мере, в 100 раз большей, такой как, например, в 500 раз более высокая аффинность. Даже предпочтительнее, она связывается с антигеном-мишенью с аффинностью, по меньшей мере, в 1000 раз большей, чем с эпитопом подобной структуры, такой как, например, по меньшей мере, в 10000 раз более высокая аффинность, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, в 100000 раз более высокая аффинность

Термин «антиген, экспрессированный на опухолевых клетках» относится к антигену, который или не экспрессируется на неопухолевых клетках, или экспрессируется на опухолевых клетках в большем количестве, чем на неопухолевых клетках.

Предпочтительно антиген экспрессируется на опухолевых клетках в количестве, по меньшей мере, в два раза большем, чем на неопухолевых клетках, предпочтительнее, по меньшей мере, в пять раз большем количестве, таком как, например, по меньшей мере, в 10 раз большее количество, даже предпочтительнее, по меньшей мере, в 100 раз большее количество, такое как, например, по меньшей мере, в 1000 раз большее количество, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, в 10000 раз большее количество. Подходящие антигены-мишени включают любой такой антиген, который экспрессируется более интенсивно на опухолевых клетках, предпочтительно, антиген является одним из антигенов, определенных в данном описании ниже.

Термин «(поли)пептид», используемый в связи с настоящим изобретением, описывает линейные молекулярные цепи аминокислот, включая одноцепочечные белки или их фрагменты. Термин относится к группе молекул, которые включают группу пептидов, состоящую из аминокислот числом до 30, а также группу полипептидов (также называемых в данном описании белками), состоящих из более чем 30 аминокислот.

Кроме того, настоящим изобретением также охватываются пептидомиметики такого (поли)пептида, при этом аминокислотная(ые) и/или (поли)пептидная(ые) связь(и) заменена(ы) функциональными аналогами. Такие функциональные аналоги включают все известные аминокислоты и иные, чем аминокислоты, кодируемые геном 20, такие как селеноцистеин. Термин «(поли)пептид» также относится к природным модифицированным (поли)пептидам, где модификация осуществлена, например, путем гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, и подобные модификации, которые хорошо известны в технике.

Согласно настоящему изобретению, связывающая молекулы включает два связывающих (поли)пептида, определенных в (a) и (b).

Первый связывающий (поли)пептид специфически связывается с первым эпитопом на указанном антигене, экспрессированном на опухолевых клетках, и представляет собой полипептид, образованный из Fyn SH3. Следует иметь в виду, что в связывающей

молекуле по изобретению могут присутствовать одна или несколько копий указанного первого связывающего (поли)пептида, например, две, три или четыре копии первого связывающего (поли)пептида.

Эпитоп может представлять собой конформационный или линейный эпитоп. В полипептидных антигенах конформационный (или прерывистый) эпитоп характеризуется присутствием двух или больше дискретных аминокислотных остатков, которые разделены в первичной последовательности, но располагаются близко друг к другу на поверхности молекулы, когда полипептид складывается в нативную трехмерную структуру, составляющую эпитоп (Sela (1969), *Science*, 166, 1365; и Laver (1990), *Cell*, 61, 553-6). Два или больше дискретных аминокислотных остатков, вносящих вклад в эпитоп, присутствуют в отдельных участках или даже в одной или нескольких (поли)пептидных цепях антигена. Напротив, линейный или непрерывный эпитоп состоит из двух или больше дискретных аминокислотных остатков, которые располагаются вблизи друг друга в одном линейном сегменте (поли)пептидной цепи.

Термин «полипептид, образованный из Fyn SH3», в данном случае используемый взаимозаменяемо с термином «финомер», относится к связывающему (поли)пептиду, образованному не от иммуноглобулина (например, так называемому каркасу, как описано выше), образованному из домена Fyn SH3 человека. Образованные из Fyn SH3 полипептиды хорошо известны в технике и описаны, например, в Grabulovski et al. (2007), *JBC*, 282, p. 3196-3204, или в WO 2008/022759, Bertschinger et al. (2007), *Protein Eng. Des. Sel.*, 20(2): 57-68, Gebauer and Skerra (2009), *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 13: 245-255).

Домен SH3 киназы Fyn (Fyn SH3) включает 63 остатка, а именно, аминокислоты 83-145 последовательности, описанной в Semba et al. (1986) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (15): 5459-63), и Kawakami et al. (1986) (*Mol. Cell Biol.*, 6(12): 4195-201), с

последовательностью

GVTLFVALYDYEARTEDDLFSFKGEKFQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIP

SNYVAPVDSIQ, показанной в SEQ ID NO: 164. Fyn представляет собой член Src семейства тирозинкиназ в 59 кД. В результате альтернативного сплайсинга белок Fyn существует в двух различных изоформах, отличающихся их киназными доменами: одна форма обнаружена в тимocyтах, спленocyтах и некоторых гематолифоидных клеточных линиях, в то время как вторая форма накапливается в основном в головном мозгу (Cooke and Perlmutter (1989), *New Biol.* 1(1): 66-74). Биологические функции Fyn, которая является внутриклеточным белком, разнообразны и включают передачу сигнала через Т-клеточный рецептор, регуляцию функции головного мозга, а также передачу сигнала, опосредуемую слипанием (Resh (1998), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30(11): 1159-62). Как и другие домены SH3, Fyn SH3 состоит из двух антипараллельных β -листов и содержит две эластичные петли (петли RT-Src и n-Src) для того, чтобы взаимодействовать с другими белками. Последовательности двух эластичных петель (называемых RT-Src- и n-Src-петлями) подчеркнуты соответственно один и два раза. Аминокислотная последовательность Fyn SH3 полностью консервативна у человека, мыши, крысы и обезьяны (гиббона).

Как показано в технике (WO 2008/022759; Grabulovski et al. (2007), *JBC*, 282, p. 3196-3204), домен Fyn SH3 является особенно привлекательным каркасом для получения связывающих белков, т.н., финомеров. Это разумно, поскольку финомеры (i) могут быть экспрессированы в бактериях в растворимой форме в больших количествах, (ii) не образуют агрегатов при хранении в растворе, (iii) являются весьма устойчивыми ($T_{пл}$ 70,5°C), (iv) не имеют цистеиновых остатков и (v) первоначально происходят от

человека, отличаясь полностью консервативной аминокислотной последовательностью от мыши до человека, причем за счет этого снижаются нежелательные иммуногенные реакции.

В технике описано получение производных Fyn SH3 полипептида, подходящих для
 5 определенного антигена-мишени. Например, можно создать библиотечку различных Fyn SH3, в которых изменена последовательность, показанная выше в SEQ ID NO: 164. Предпочтительно изменение осуществляют (i) в последовательности, представляющей RT-петлю, или, необязательно, в позиции в пределах двух аминокислот, граничащих с
 10 указанной последовательностью (т.е., последовательностью DYEARTEDDL, показанной выше в SEQ ID NO: 164), или (ii) Scr-петле или, необязательно, в позиции в пределах двух аминокислот, граничащих с указанной последовательностью (т.е., последовательностью LNSSEG, показанной выше в SEQ ID NO: 164), или (iii) в обеих последовательностях одновременно. Предпочтительно изменение представляет собой замену, делецию или присоединение, описанные в технике (см., например, WO 2008/
 15 022759; Grabulovski et al. (2007), JBC, 282, p. 3196-3204). Средства и способы изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в технике и описаны в технике, например, в Grabulovski et al. (2007), JBC, 282, p. 3196-3204. Затем такую библиотечку Fyn SH3 можно клонировать в фагмидный вектор, такой как, например, pHEN1 (Hoogenboom et al. "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying
 20 antibody (Fab) heavy and light chains", Nucleic Acids Res., 19(15): 4133-7, 1991), и затем библиотечку презентируют на фагах (фаговый дисплей) и подвергают пэннингу, предпочтительно, повторяющимся циклам пэннинга, например, по меньшей мере, двум, предпочтительнее, по меньшей мере, трем циклам пэннинга против соответствующего антигена. Затем можно выполнить скрининг на связывание (поли)пептидов
 25 установленными методами, такими как, например, моноклональный фаговый ELISA. Затем можно использовать секвенирование идентифицированных таким образом клонов для обнаружения обогащенных последовательностей. Идентифицированный таким образом связывающий (поли)пептид затем можно подвергнуть дополнительным стадиям созревания, например, путем генерации дополнительных библиотек на основе изменений
 30 идентифицированных последовательностей и повторенных стадий фагового дисплея и пэннинга. Наконец, можно проанализировать перекрестную реактивность и иммуногенность полученного образованного из Fyn SH3 полипептида, и можно выбрать образованный из Fyn SH3 полипептид, специфический для антигена-мишени.

Такие способы скрининга фагового дисплея и оптимизации связывающих (поли)
 35 пептидов вообще известны в технике.

Второй связывающий (поли)пептид, определенный в (b), специфически связывается со вторым эпитопом указанного антигена, экспрессированного на опухолевых клетках. Соответственно, и как описано в данном описании выше, это означает, что тот же антиген связывается таким вторым связывающим (поли)пептидом, однако связывается
 40 другой эпитоп на указанном антигене. Термин «другой» эпитоп относится к эпитопу, который не перекрывается эпитопом, с которым специфически связывается первый связывающий (поли)пептид. Соответственно связывание одного связывающего (поли)пептида согласно изобретению не блокирует связывание второго связывающего (поли)пептида, причем таким образом создается возможность одновременного связывания
 45 обоих связывающих (поли)пептидов. Второй связывающий (поли)пептид может представлять собой любой (поли)пептид, способный специфически связываться с эпитопом-мишенью, такой как, например, антитело или любой из описанных выше связывающих реагентов неиммуноглобулинового происхождения или каркасы,

предпочтительно, каркас, выбранный из группы, состоящей из аффител (на основе Z-домена стафилококкового белка A), доменов типа Kunitz, аднектинов (на основе 10-го домена фибронектина человека), антикалинов (образованных из липокалинов), DARPins (образованных из белков анкиринового повтора), авимеров (образованные из полимерного LDLR-A). Все такие каркасы хорошо известны в технике и описаны в ссылаках, цитированных в данном описании выше.

Связывающие (поли)пептиды, заключенные в связывающей молекуле по изобретению, могут образовывать одну полипептидную цепь или могут присутствовать в связывающей молекуле по изобретению в виде нескольких полипептидных цепей, которые могут ковалентно или нековалентно связываться друг с другом. Когда связывающие (поли)пептиды образуют одну полипептидную цепь, они могут располагаться в любом порядке в пределах каждой молекулы, например, (a)-(b) или (b)-(a). Предпочтительнее связывающие (поли)пептиды (a) и (b) располагаются в изложенном порядке, например, в порядке (a)-(b) в направлении от N-конца к С-концу. Когда связывающие (поли)пептиды не образуют одну полипептидную цепь, они еще могут образовывать линейную цепь, в которой они связываются друг с другом. В таком случае они также могут располагаться в любом порядке в указанной линейной цепи, таком как, например, (a)-(b) или (b)-(a). Предпочтительнее связывающие (поли)пептиды (a) и (b) располагаются в изложенном порядке, например, в порядке (a)-(b). Связывающие (поли)пептиды могут располагаться к каждому другому в порядке голова-к-хвосту, т.е., один связывающий (поли)пептид (ковалентно или нековалентно) связывается своим N-концом с С-концом другого связывающего (поли)пептида, или может располагаться в порядке голова-к-голове или хвост-к-хвосту, т.е., один связывающий (поли)пептид связывается (ковалентно или нековалентно) своим N-концом с N-концом другого связывающего (поли)пептида, или своим С-концом с С-концом другого связывающего (поли)пептида. Следует иметь в виду, что связывающие (поли)пептиды также могут образовывать нелинейную компоновку. Также следует иметь в виду, что существует требование ко всем связывающим молекулам, описанным в данном описании, что связывающая активность двух связывающих (поли)пептидов с их соответствующими эпитопами сохраняется или, по существу, сохраняется, как определено в данном описании ниже, после образования связывающих молекул, т.е., ковалентной или нековалентной ассоциации двух связывающих(поли)пептидов. Когда связывающая молекула образуется из нескольких (поли)пептидных цепей, предпочтительно, когда такие цепи ковалентно связываются друг с другом.

Связывающую молекулу по изобретению можно получить любым из способов получения (поли)пептидов, известных в технике. Например, как подробнее описано в данном описании ниже, одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих связывающую молекулу по настоящему изобретению, могут быть экспрессированы в подходящем хозяине, и затем полученную таким образом связывающую молекулу можно выделить. Альтернативным способом получения связывающей молекулы по изобретению является трансляция мРНК *in vitro*. Подходящие бесклеточные экспрессирующие системы для применения согласно настоящему изобретению включают лизат кроличьих ретикулоцитов, экстракт зерна пшеницы, микросомные мембраны поджелудочной железы собаки, экстракт S30 *E. coli* и спаренные системы транскрипция/трансляция, такие как TNT-система (Promega). Такие системы создают возможность эксперссии рекомбинантных (поли)пептидов после добавления клонирующих векторов, фрагментов ДНК или последовательностей РНК, содержащих кодирующие участки и соответствующие промоторные элементы.

Кроме получения рекомбинанта, связывающую молекулу по изобретению можно получить синтетически, например, прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных методов (сравни Stewart et al. (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc, 85 (1963), 2149-2154). Синтез синтетических белков можно выполнить с использованием ручных методов или автоматически. Автоматизированный синтез можно осуществить, например, с использованием пептидного синтезатора Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) согласно инструкциям, предоставленным изготовителем. Различные фрагменты можно химически синтезировать по отдельности и объединить с использованием химических способов получения полноразмерных молекул. Как указано выше, можно использовать химический синтез, такой как твердофазная процедура, описанная в Houghton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (82), (1985), 5131-5135. Кроме того, связывающую молекулу по изобретению можно получить полусинтетически, например, путем комбинирования получения рекомбинантным и синтетическим методом.

Согласно настоящему изобретению, неожиданно обнаружилось, что связывающая молекула, включающая полипептид, образованный из Fyn SH3, и второй связывающий (поли)пептид со специфичностью связывания с тем же антигеном, но другим эпитопом указанного антигена, показывает в результате щревосходную антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеток. Такая активность выше, чем активность моноспецифического полипептида, образованного из Fyn SH3 (в двухвалентном формате как гибрид Fc), или одного второго связывающего (поли)пептида, и самое неожиданное, также значительно выше, чем антипролиферативное действие обоих соединений, взятых в комбинации. Соответственно, получение связывающей молекулы по настоящему изобретению приводит к улучшенному действию по сравнению с двумя отдельными связывающими (поли)пептидами.

Соответственно, настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, при этом связывание указанной связывающей молекулы с опухолевыми клетками, экспрессирующими соответствующий антиген-мишень на своей поверхности, приводит к улучшенному ингибированию опухолевой активности, которое выше, чем ингибирование опухолевой активности, полученное путем комбинированного связывания двух моноспецифических связывающих белков, при этом первый моноспецифический связывающий белок включает или состоит из полипептида, образованного из Fyn SH3 (a), и второй моноспецифический связывающий белок включает или состоит из связывающего (поли)пептида (b). Предпочтительно улучшенное ингибирование опухолевой активности является синергическим, т.е., больше, чем аддитивный эффект по сравнению с ингибированием опухолевой активности, полученным путем комбинированного связывания двух моноспецифических связывающих белков.

В предпочтительном воплощении связывающей молекулы по изобретению антиген, экспрессированный на опухолевых клетках, выбирают из группы, состоящей из HER2, других членов семейства EGFR, включая HER1, HER3 и HER4, других семейств тирозинкиназных рецепторов, включая ALK, AXL, DDR, EPH, FGFR, EPH, FGFR, INSR, MET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR, ROS, RYK, TIE, TRK, VEGFR, семейства AATYK, EpCAM, CD20, CD33, CD52 и CD30.

HER2 определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к рецептору типа 2 эпидермального фактора роста человека (также называемому HER2/neu или ErbB-2, см. выше), рецептору в 185 кД, впервые описанному в 1984 (Schlechter et al. (1984), *Nature*, 312: 513-516). Человеческий HER2

(SEQ ID NO: 171) представлен ссылкой NCBI NP_004439 (дата публикации 26 февр. 2012) и описан в технике, например, в Robinson et al. (2000), *Oncogene*, 19: 5548-5557, а также в ссылках, цитированных в данном описании выше. Другие мишени семейств тирозинкиназных рецепторов (EGFR, ALK, AXL, DDR, EPH, FGFR, EPH, FGFR, INSR, MET, MUSK, PDGFR, PTK7, RET, ROR, ROS, RYK, TIE, TRK, VEGFR, AATYK) хорошо известны в технике и описаны, в том числе, в ссылках в Robinson et al. (2000), *Oncogene*, 19: 5548-5557.

ЕрСAМ определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к фактору адгезии эпителиальных клеток, который представляет собой панэпителиальный дифференцировочный антиген, который экспрессируется почти на всех карциномах. Человеческий ЕрСAМ представлен UniProtKB/Swiss-Prot, инвентарный номер P16422.2 (дата публикации 22 февр. 2012) и описан в технике, например, в Strnad et al. (1989), *Cancer Res.*, 49(2): 314-317.

CD20 определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к антигену В-лимфоцитов CD20. Человеческий CD20 представлен ссылочной последовательностью NCBI NP_690605.1 (дата публикации 8 янв. 2012) и описан в технике, например, в Dawidowicz et al. (2011), *Clin. Exp. Rheumatol.*, 29(5): 839-842.

CD33 определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к антигену CD33. Человеческий CD33 представлен ссылочной последовательностью NCBI NP_001763.3 (дата публикации 18 дек. 2011) и описан в технике, например, в Raponi et al. (2011), *Leuk. Lymphoma*, 52(6): 1098-1107.

CD52 определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к антигену CD52 (антиген САМРАТН-1). Человеческий CD52 представлен GenBank, инвентарный номер EAX07822.1 (дата публикации 4 февр. 2010) и описан в технике, например, в Venter et al. (2001), *Science*, 291(5507): 1304-1351.

CD30 определяется согласно области техники, к которой относится данное изобретение, и относится к антигену CD30. Человеческий CD30 представлен GenBank, инвентарный номер AAA51947.1 (дата публикации 1 ноя. 1994) и описан в технике, например, в Durkop, H et al. (1992), *Cell*, 68(3): 421-427.

В предпочтительном воплощении биспецифической связывающей молекулы по изобретению антигеном является HER2.

В другом предпочтительном воплощении биспецифической связывающей молекулы по изобретению второй связывающий (поли)пептид представляет собой антитело.

Антитело может представлять собой моноклональное или поликлональное антитело любого класса антител. Термин «антитело» также включает фрагменты антитела или его производные, которые еще сохраняют специфичность связывания полноразмерного или немодифицированного антитела. Антитело по изобретению также включает такие воплощения, как синтетические, химерные, одноцепочечные и гуманизированные антитела.

Термин «фрагмент антитела» относится к фрагментам, таким как (i) Fab-фрагмент, (ii) F(ab')₂-фрагмент, (iii) Fd-фрагмент (состоящий из доменов VHC и CH1), (iv) Fv-фрагмент и (v) изолированный участок, определяющий комплементарность (CDR), имеющий достаточный каркас для специфического связывания, например, антигенсвязывающую часть вариабельного участка. Термин «производное антитела» в контексте изобретения определяет химически модифицированные антитела и фрагменты антител. Определение включает svFv-фрагменты, одно доменные антитела и т.д.. Соответственно, производные антител обычно представляют собой (поли)пептиды,

образованные из молекул антител, и/или (поли)пептиды, которые модифицированы химическими/биохимическими методами или методами молекулярной биологии. Минимальным требованием для специфического взаимодействия фрагмента антитела со специфическим эпитопом является присутствие одного или нескольких CDR из

5 вариабельной тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельной легкой цепи (V_L) исходного антитела в контексте, который допускает подбор фрагмента и эпитопа. Такой контекст может быть обеспечен использованием подходящего каркаса антитела. Как известно в технике, термин «каркас» применительно к антителу или фрагменту антитела определяет аминокислотную последовательность, которая функционирует как спейсер

10 между CDR, а также наращивает их N-концы и C-концы и обеспечивает структуру, которая допускает образование CDR антигенсвязывающего сайта. Модификация каркаса или последовательностей CDR, например, для улучшения аффинности связывания, методами молекулярной биологии может включать модификацию (поли) пептидов с использованием обычных методов, известных в технике, например, с

15 использованием аминокислотной(ых) делеции(й), вставки(вставок), замены(замен), добавления(й), и/или рекомбинации(й) и/или другой(их) модификации(й) (например, посттрансляционных и химических модификаций, таких как гликозилирование или фосфорилирование), известных в технике, одних или в комбинации. Способы введения таких модификаций в последовательность ДНК, лежащую в основе аминокислотной

20 последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалистам в данной области техники, см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition 1989 and 3rd edition 2001; Gerhardt et al., *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM Press, 1994; Lefkovits, *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, Academic Press, 1997; или

25 Golemis, *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

Антитело, согласно изобретению, способно специфически связываться/ взаимодействовать с эпитопом. Эпитоп может представлять собой полипептидную структуру, а также соединения, которые не включают аминокислоты, такие как,

30 например, полисахариды. Термин «специфически связываться/взаимодействовать с» определен в данном описании выше.

Предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Даже предпочтительнее, (моноклональное) антитело представляет собой антитело класса IgG, IgA, IgE, IgD или IgM (а также их подтипов (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4)).

35 Следует иметь в виду, что образованный из Fyn SH3 полипептид, представляющий собой первый связывающий (поли)пептид, может быть соединен с антителом в любой возможной позиции до тех пор, пока связывающие способности двух связывающих (поли)пептидов сохраняются или по существу сохраняются, как определено в данном описании ниже. Например, образованный из Fyn SH3 полипептид, представляющий

40 собой первый связывающий (поли)пептид, может быть соединен с антителом по N- или C-концу или тяжелой цепи или легкой цепи, когда используется полное антитело. Предпочтительно образованный из Fyn SH3 полипептид соединяется с N-концом легкой цепи антитела.

В другом предпочтительном воплощении связывающей молекулы по настоящему изобретению первый и второй связывающие (поли)пептиды соединяются линкером

Термин «линкер», используемый согласно настоящему изобретению, относится к последовательным аминокислотам (т.е., пептидным линкерам), а также к непептидным линкерам, которые разделяют связывающие (поли)пептиды связывающей молекулы

по изобретению. Также будет очевидно, что когда связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой одну полипептидную цепь, линкер представляет собой пептидный линкер.

Характер, т.е. длина и/или строение (как, например, аминокислотная последовательность) линкера могут модифицировать или улучшить устойчивость и/или растворимость молекулы, могут улучшить гибкость полученной связывающей молекулы и/или могут улучшить связывание с антигеном-мишенью за счет уменьшения пространственных затруднений. Длина и строение линкера зависят от строения соответствующих связывающих (поли)пептидов связывающей молекулы по изобретению. Специалисту хорошо известны способы испытания на пригодность различных линкеров. Например, можно легко проверить свойства связывающей молекулы, анализируя ее на аффинность связывания с использованием различных типов линкеров. Кроме того, можно выполнить соответствующие измерения для каждого одного связывающего (поли)пептида и сравнить с аффинностью связывания связывающей молекулы. Устойчивость полученной молекулы можно измерить методами, известными в технике, такими как, например, использование метода ELISA для определения остаточной связывающей способности молекулы после инкубации в человеческой сыворотке при 37°C в течение некоторых периодов времени.

Пептидные линкеры, предусмотренные настоящим изобретением, представляют собой (поли)пептидные линкеры, состоящие из аминокислот. Предпочтительно линкер имеет от 1 до 100 аминокислот в длину. Предпочтительнее линкер имеет от 5 до 50 аминокислот в длину, и даже предпочтительнее, линкер имеет от 10 до 20 аминокислот в длину. Наиболее предпочтительно, линкер имеет 15 аминокислот в длину. В предпочтительном воплощении линкер представляет собой гибкий линкер с, например, аминокислотами аланином и серином или глицином и серином. Предпочтительно линкерные последовательности представляют собой (Gly₄Ser)₁, (Gly₄Ser)₂ или (Gly₄Ser)₃. Наиболее предпочтительно, линкер представляет собой (Gly₄Ser)₃.

Термин «непептидный линкер», используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к группам-связкам с двумя или больше реакционноспособными группами, но исключая пептидные линкеры, определенные выше. Например, непептидный линкер может представлять собой полимер, такой как, например, полиэтиленгликоль, имеющий реакционноспособные группы на обоих концах, которые по отдельности связываются с реакционноспособными группами связывающих частей молекулы по изобретению, например, аминоконцом, лизиновым остатком, гистидиновым остатком или цистеиновым остатком. Реакционноспособные группы полимера включают гидроксильную группу, альдегидную группу, пропиональдегидную группу, бутилальдегидную группу, малеимидную группу, кетонную группу, винилсульфоновую группу, тиольную группу, гидразидную группу, карбонилдиимидазольную (CDI) группу, нитрофенилкарбонатную (NPC) группу, тризилатную группу, изоцианатную группу и сукцинимидные производные. Примеры сукцинимидных производных включают сукцинимидилпропионат (SPA), сукцинимидилбутановую кислоту (SBA), сукцинимидилкарбоксиметилат (SCM), сукцинимидилсукцинамид (SSA), сукцинимидилсукцинат (SS), сукцинимидилкарбонат и N-гидроксисукцинимид (NHS). Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного полимера могут быть одинаковыми или различными. Например, непептидный полимер может содержать малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу на другом конце. Предпочтительно полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

Наиболее предпочтительно линкер представляет собой пептидный линкер.

В другом предпочтительном воплощении связывающая молекула по изобретению также включает, по меньшей мере, один дополнительный (поли)пептид.

Неограничительными примерами таких дополнительных (поли)пептидов являются фармацевтически и/или диагностически активные компоненты, в том числе метки или функциональные (поли)пептиды, подходящие для улучшения характеристик связывающей молекулы по изобретению.

Фармацевтически и/или диагностически активные компоненты можно, например, выбрать из цитокинов, токсичных соединений, хемокинов, ферментов, флуоресцентных красителей и фотосенсибилизаторов, фактора предшественника коагулянта, предпочтительно, тканевого фактора, радионуклеидов или компонентов, которые модулируют время полужизни в сыворотке связывающей молекулы по изобретению.

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

Примеры токсичных соединений включают, без ограничения, калихеамицин, мейтансиноид, неокарзинон, эсперамицин, динемин, кедарцидин, мадуропептин, дезоксорибицин, даунорубин, ауристатин, цепь рицин-А, модекцин, усеченный экзотоксин A *Pseudomonas*, дифтерийный токсин и рекомбинантный гелонин.

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

Флуоресцентные красители включают, например, красители Alexa Fluor или Cy, и фотосенсибилизаторы включают, например, фототоксичный красный белок флуоресценции KillerRed или гематопорфирин.

Неограничительные примеры ферментов включают ферменты для активации пролекарств, предпочтительно, ферменты, выбранные из группы, состоящей из карбоксипептидаз, глюкуронидаз и глюкозидаз.

Радионуклеиды можно выбрать, например, из группы гамма-испускающих изотопов, предпочтительно ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I ; из группы бета-излучателей, предпочтительно, ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu ; или из группы альфа-излучателей, предпочтительно, ^{213}Bi , ^{211}At .

Примеры компонентов, которые модулируют время полужизни в сыворотке, включают, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), Fc-домены антител, альбуминсвязывающие белки и конформационно расстроенные полипептидные последовательности.

Неограничительные примеры меток включают Strep-метки, His-метки, Muc-метки, TAP-метки или Flag-метки. Дополнительные функциональные (поли)пептиды представляют собой, например, пептиды секреции, такие как лидер секреции каппа, или пептиды, обеспечивающие сайты N-гликозилирования.

Как отмечалось выше, некоторые из дополнительных (поли)пептидов могут иметь дополнительную фармацевтическую или диагностическую активность или могут усиливать устойчивость связывающей молекулы по изобретению, улучшая посредством этого ее активность ингибирования роста опухоли, в то время как другие дополнительные (поли)пептиды могут взамен облегчить получение и/или очистку связывающей молекулы.

Способы добавления определенных выше дополнительных (поли)пептидов к

связывающей молекуле по изобретению хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Sambrook, 2001, цит. выше. Следует иметь в виду, что дополнительные (поли)пептиды могут быть связаны нековалентно со связывающей молекулой по изобретению или могут быть связаны ковалентно, например, они могут образовывать слитый белок со связывающей молекулой, например, они могут образовывать одну полипептидную цепь. Такой слитый белок может быть, например, кодирован одной молекулой нуклеиновой кислоты.

Настоящим изобретением также охватываются мультимеры, такие как, например, димеры, тримеры, тетрамеры и т.д., образованные связывающей молекулой по изобретению, необязательно включающей дополнительные (поли)пептиды, определенные выше. Такие мультимеры могут образовываться путем ковалентной или нековалентной ассоциации, предпочтительно, путем ковалентной ассоциации. Предпочтительно мультимеры образуются через линкеры, определенные в данном описании выше, предпочтительно, определенные выше пептидные линкеры. Предпочтительнее линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$ или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. Наиболее предпочтительно, линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

В другом предпочтительном воплощении связывающей молекулы по изобретению первый связывающий (поли)пептид включает или состоит из (i) аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-152, или (ii) аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В тех воплощениях, где связывающий (поли)пептид включает (а не состоит из) указанные аминокислотные последовательности, дополнительные аминокислоты надстраивают специфическую последовательность или по N-концу или по C-концу или по обоим концам. Предпочтительно по N-концу присутствуют не более 50 дополнительных аминокислот, и не более 50 дополнительных аминокислот присутствуют по C-концу. Предпочтительнее не более 40, например, не более 30, предпочтительнее, не более 20, например, не более 10, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 и, даже предпочтительнее, не более 1 дополнительной аминокислоты независимо присутствует по любому одному N- или C-концу или по обоим концам. Следует иметь в виду, что существует предварительное требование, что связывающая способность связывающей молекулы в отношении двух различных эпитопов антигена-мишени в присутствии таких дополнительных аминокислот сохраняется или по существу сохраняется, как определено в данном описании ниже. Дополнительные последовательности могут включать, например, последовательности, введенные, например, для очистки. Предпочтительно первый связывающий (поли)пептид состоит из аминокислотной последовательности, упомянутой в (i) или (ii). Предпочтительнее первый связывающий (поли)пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Согласно настоящему изобретению термин «% идентичности последовательностей» описывает число совпадений («попаданий») аминокислот/нуклеотидов в двух или большем количестве выровненных аминокислотных или нуклеотидных последовательностей по сравнению с числом аминокислотных остатков или нуклеотидов, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей или нуклеиновой кислоты (или части по сравнению с целым). Иными словами, с использованием выравнивания двух или больше последовательностей или субпоследовательностей можно определить процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 65% или 80% идентичность), когда (суб)

последовательности сравнивают и выравнивают для максимального соответствия в окне сравнения или в определенном участке при измерении с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в технике, или когда выравнивают вручную и проверяют визуально. Предпочтительными (поли)пептидами согласно изобретению являются (поли)пептиды, в которых описанная идентичность существует в участке, который составляет, по меньшей мере, примерно 15-25 аминокислот в длину, предпочтительнее, в участке, который составляет, по меньшей мере, примерно 30-50 аминокислот в длину. Более предпочтительными (поли)пептидами согласно настоящему изобретению являются (поли)пептиды, в которых описанная идентичность существует по всей длине (поли)пептидов, конкретно упомянутых в данном описании. Специалистам в данной области техники будет известно, как определить процент идентичности между/среди последовательностей с использованием, например, алгоритмов, таких как основанные на алгоритме NCBI BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, и David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402), компьютерной программе CLUSTALW (Thompson, Nucl. Acids Res., 2 (1994), 4673-4680) или FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci, 1988, 85; 2444).

Согласно данному изобретению предпочтительно используют алгоритм NCBI BLAST. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует длину слова по умолчанию (W) 3 и ожидание (E) 10. Программа BLASTN для нуклеотидных последовательностей использует длину слова по умолчанию (W) 11, ожидание (E) 10, M=5, N=4, и сравнение обеих цепей. Оценочная матрица BLOSUM62 (Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 89: 10915) использует выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=4, и сравнение обеих цепей. Соответственно все (поли)пептиды, имеющие идентичность последовательностей, по меньшей мере, 80% при определении с помощью программы NCBI BLAST попадают в объем изобретения.

Согласно такому воплощению настоящего изобретения также охватываются последовательности с, по меньшей мере, 65% идентичностью, такой как, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85% и, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей. Даже предпочтительнее идентичность составляет, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99,5%.

Аминокислотная последовательность с, по меньшей мере, 65% идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1,

предпочтительно имеет следующую формулу I:

GVTLFVALYDYX₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀LSFHKGEKFQIL X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄

X₁₅ X₁₆G X₁₇WW X₁₈ARSLTTGE X₁₉G X₂₀IPS X₂₁YVAPVDSIQ (формула I),

при этом X₁ - X₇ и X₁₁ - X₁₃ и X₁₇ - X₂₁ выбирают, каждый независимо, из G, V, T, L, F, A, Y, D, S, H, K, E, Q, I, W, R, M, P, N и C; предпочтительнее, из G, V, T, L, F, A, Y, D, S, H, K, E, Q, I, W, R, M, P и N; и

при этом X₈ - X₁₀ и X₁₁ - X₁₆ выбирают, каждый независимо, из G, V, T, L, F, A, Y, D, S, H, K, E, Q, I, W, R, M, P, N и C; предпочтительнее, из G, V, T, L, F, A, Y, D, S, H, K, E, Q, I, W, R, M, P и N;

или при этом один или больше из X₈ - X₁₀ и X₁₁ - X₁₆ отсутствуют.

Предпочтительнее

X₁ выбирают из T, E, D, Q, Y, V, W, N, S, F или K;

X_2 выбирают из S, A, R или T;

X_3 выбирают из Y, R, H, T, N, V, W или S;

X_4 выбирают из N, D, M, Y, R, P, E, L, H, T, G или F;

5 X_5 выбирают из T, S, P, Q, R, K, G, Q, A, D, M, N, L, F, Y или E;

X_6 выбирают из R, M, K, D, F, T, G, H, S, P, N, Q, Y, L, A или P;

X_7 выбирают из D, G, V, L, H, N, R, F, S или A;

X_8 выбирают из G, S, E, D, P, Y или отсутствует;

10 X_9 выбирают из Q, D, S, H или отсутствует;

X_{10} выбирают из D, V или отсутствует;

X_{11} выбирают из R, K, Q, N, S, G, W, M, H, L, F, E, T, P, A, D или V;

X_{12} выбирают из M, R, E, G, N, D, S, A, Q, F, P, K, Y, T, H, V, L или W;

15 X_{13} выбирают из E, W, P, R, K, S, V, N, D, H, G, T, Q, A, Y, L или M;

X_{14} выбирают из D, R, Q, S, A, N, P, I, H, T, Y, E, L, K, M, V, I, W или отсутствует;

X_{15} выбирают из G, S, I, L, A, V, T, E, D, Q, R, P, K, M, H, Y или отсутствует;

X_{16} выбирают из K, G, R, A, T, V, S, I, E, Q, P, D, N, H или отсутствует;

X_{17} выбирают из V, D, T, I или Y;

20 X_{18} выбирают из E, A, R, T или Q;

X_{19} выбирают из T, I или V;

X_{20} выбирают из Y, L или F;

X_{21} выбирают из N or S.

25 В предпочтительном воплощении остатки X в формуле I выбирают независимо из $X_1 - X_{10}$, представляющих собой TSYNTRD (т.е., при этом $X_8 - X_{10}$ отсутствуют); $X_{11} - X_{16}$, представляющих собой RMED (т.е., при этом $X_{14} - X_{16}$ отсутствуют); X_{17} , представляющего собой V; X_{18} , представляющего собой E; X_{19} , представляющего собой T; X_{20} , представляющего собой Y, и/или X_{21} , представляющего собой N.

Предпочтительно связывающий (поли)пептид, включающий или состоящий из аминокислотной последовательности имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, сохраняет или по существу сохраняет связывающую способность связывающего (поли)пептида, состоящего из SEQ ID NO: 1, т.е., прочность связывания в отношении соответствующего эпитопа-мишени сохраняется или по существу сохраняется.

40 Образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1) имеет константу диссоциации для своего специфического эпитопа на HER2 7×10^{-8} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Для этого образованный из Fyn SH3 полипептид захватывается, например, специфическими антителами с меткой His, которые иммобилизованы на сенсорном чипе BIAcore. После введения антигена, содержащего специфический эпитоп, контролируют образование комплекса, и получают константы кинетической ассоциации (k_{on}) и кинетической диссоциации (k_{off}) или

45 константы диссоциации (K_D) путем построения кривых с использованием оценочной программы BIAcore. Соответственно, связывающая способность связывающего (поли)пептида, включающего или состоящего из аминокислотной последовательности имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательностей с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 1, по существу сохраняется, если, предпочтительно, в одних и тех же условиях, сохраняется константа диссоциации для связывания HER2, по меньшей мере, 1×10^{-4} М, такая как, например, по меньшей мере, 1×10^{-5} М, предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-6} М, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1×10^{-7} М. Также изобретению соответствуют связывающие (поли)пептиды, имеющие константу диссоциации, по меньшей мере, 1×10^{-8} М, такую как, например, по меньшей мере, 1×10^{-9} М, предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-10} М, такую как, например, по меньшей мере, 1×10^{-11} М, даже предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-12} М, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1×10^{-13} М. Способы оценки связывающей способности хорошо известны в технике и включают, без ограничения, методы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или ELISA.

Как показано в прилагаемых примерах, связывающие молекулы, включающие образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1), и вторую специфичность связывания, специфически связываются с опухолевым антигеном HER2 и дают улучшенное ингибирующее действие со вторым связывающим (поли)пептидом. Соответственно, предпочтительно, что связывающая молекула по изобретению включает образованный из Fyn SH3 полипептид, включающий или состоящий из SEQ ID NO: 1.

Как это следует из примера 14, приведенного в данном описании ниже, образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1) связывается с эпитопом HER2, который располагается в пределах домена IHER2 (SEQ ID NO: 172). Вовлеченные остатки бежа HER2 определяют с использованием сканирования аланином, и находят, что аминокислотные позиции T166, R188, P197, S202 и R203 домена I HER2 вовлечены в связывание между образованным из Fyn SH3 полипептидом C12 и HER2.

В результате в другом предпочтительном воплощении связывающей молекулы по изобретению первый связывающий (поли)пептид включает или состоит из аминокислотной последовательности, которая связывается с эпитопом в пределах домена I HER2 (SEQ ID NO: 172), включающего его аминокислотные позиции T166, R188, P197, S202 и R203.

В другом предпочтительном воплощении связывающей молекулы по изобретению второй связывающий (поли)пептид представляет собой антитело, при этом (i) тяжелая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155; (ii) тяжелая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 160, и легкая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 163; (iii) тяжелая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 155; или (iv) тяжелая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 160, и легкая цепь антитела включает или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 65% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 163.

Примеры молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелые и легкие цепи SEQ ID NO: 154, 155, 160 и 163, показаны в SEQ ID NO: 165, 166, 168 и 169, соответственно.

Согласно такому воплощению настоящего изобретения, в (iii) и (iv) также охватываются последовательности, имеющие, по меньшей мере, 65% идентичность последовательности, такую как, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85% и, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с упомянутыми аминокислотными последовательностями. Даже предпочтительнее, идентичность составляет, по меньшей мере, 95%, как, например, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 90% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99,5% с упомянутыми аминокислотными последовательностями.

Предпочтительнее антитело, определенное в (iii) или (iv), представляет собой антитело, в котором изменение в идентичности последовательностей происходит только в вариабельном домене антител, так что константный участок вариантных антител идентичен константному участку антитела, определенного в (i) и (ii), соответственно. Вариабельные домены анти-HER2 антитела 1, используемые в данном случае, располагаются в аминокислотах 1-119 SEQ ID NO: 154 и в аминокислотах 1-107 SEQ ID NO: 155, в то время как вариабельные домены анти-HER2 антитела 2, используемые в данном случае, располагаются в аминокислотах 1-120 SEQ ID NO: 160 и в аминокислотах 1-107 SEQ ID NO: 163. Даже предпочтительнее, изменение в идентичности последовательностей происходит только в доменах CDR антител, так что остальные (не-CDR) участки вариантных антител идентичны остальным (не-CDR) участкам антитела, определенного в (i) и (ii), соответственно. Домены CDR анти-HER2 антитела 1, используемые в данном случае, располагаются в аминокислотах 31-35 (CDR1), 50-66 (CDR2) и 99-108 (CDR3) SEQ ID NO: 154 и аминокислотах 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) и 89-107 (CDR3) SEQ ID NO: 155, в то время как домены CDR анти-HER2 антитела 2, используемые в данном случае, располагаются в аминокислотах 31-35 (CDR1), 50-66 (CDR2) и 99-108 (CDR3) SEQ ID NO: 160 и аминокислотах 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) и 89-107 (CDR3) SEQ ID NO: 163.

Все определения, приведенные выше в отношении первого связывающего (поли) пептида, например, в отношении термина «включающий», и предпочтительные величины идентичности последовательностей и способы их определения, применяют *mutatis mutandis* также к указанному второму связывающему (поли)пептиду связывающей молекулы по изобретению.

Кроме того, второй связывающий (поли)пептид, определенный в (ii), предпочтительно сохраняет или по существу сохраняет связывающую способность связывающего (поли) пептида, определенного в (i), и второй связывающий (поли)пептид, определенный в (iv), предпочтительно сохраняет или по существу сохраняет связывающую способность связывающего (поли)пептида, определенного в (ii). Как определено в данном описании выше, связывающая способность связывающего (поли)пептида (iii) или (iv) по существу сохраняется, если сохраняется, по меньшей мере, 60% его связывающей способности. Предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, 75% или больше, или предпочтительнее, по меньшей мере, 80% его связывающей способности. Более предпочтительно, когда сохраняется, по меньшей мере, 90%, например, по меньшей мере, 95%, даже предпочтительнее, по меньшей мере, 98%, например, по меньшей мере, 99% связывающей способности связывающего (поли)пептида, определенного в (i) или (ii), соответственно. Наиболее предпочтительно, когда связывающая способность сохраняется полностью, т.е., до 100%. Также соответствуют изобретению связывающие (поли)пептиды с повышенной связывающей способностью по сравнению со связывающими (поли)

пептидами, определенными в (i) или (ii), соответственно, т.е., с активностью более 100%. Предпочтительно связывающая способность относится к способности связывающего (поли)пептида связывать HER2. Способы оценки связывающей способности описаны в данном описании выше.

5 Антитела по данному изобретению, определенные в (i) или (ii), имеют константу диссоциации для своего специфического эпитопа на HER2 от 2×10^{-9} М до 2×10^{-10} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Для этого антитела захватываются специфическими к человеческому IgG антителами, которые
10 иммобилизованы на сенсорном чипе VIAcore. После введения антигена, содержащего специфический эпитоп, контролируют образование комплекса, и получают константы кинетической ассоциации (k_{on}) и кинетической диссоциации (k_{off}) или константы диссоциации (K_D) путем подбора кривых с использованием оценочной программы VIAcore. Соответственно, связывающая способность антитела, имеющего, по меньшей
15 мере, 65% идентичность последовательностей с антителом (i) или (ii), по существу сохраняется, если константа диссоциации для связывания HER2, измеренная, предпочтительно, в одних и тех же условиях, по меньшей мере, 1×10^{-5} М, такая как, например, по меньшей мере, 1×10^{-6} М, предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-7} М,
20 даже предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-8} М, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1×10^{-9} М, сохраняется. Также изобретению соответствуют антитела, имеющие повышенную связывающую способность по сравнению со связывающими (поли)пептидами, определенными в (i) или (ii), т.е., с активностью более 100%. Например, в данном случае предусмотрены антитела, имеющие константу диссоциации, по меньшей
25 мере, 1×10^{-10} М, такую как, например, по меньшей мере, 1×10^{-11} М, предпочтительнее, по меньшей мере, 1×10^{-12} М, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1×10^{-13} М.

Предпочтительно второй связывающий (поли)пептид представляет собой антитело,
30 при этом тяжелая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155.

Предпочтительно первый связывающий (поли)пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и второй связывающий (поли)пептид представляет
35 собой антитело, при этом тяжелая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155. Предпочтительнее, С-конец SEQ ID NO: 1 соединен с N-концом легкой цепи указанного антитела, т.е., SEQ ID NO: 155. В даже более предпочтительном воплощении связывающей молекулы по изобретению первый
40 связывающий (поли)пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, соединенной через линкер $(Gly_4Ser)_3$ со вторым связывающим (поли)пептидом, который представляет собой антитело, при этом тяжелая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155, и при этом линкер соединяет
45 С-конец SEQ ID NO: 1 с N-концом легкой цепи антитела, т.е., SEQ ID NO: 155. Аминокислотная последовательность такого слитого белка из SEQ ID NO: 1, линкера $(Gly_4Ser)_3$ и легкой цепи, представленной SEQ ID NO: 155, показана в SEQ ID NO: 159 (пример молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую аминокислотную

последовательность, показан в SEQ ID NO: 167). Следует иметь в виду, что когда в качестве второго связывающего (поли)пептида используют антитело, включающее, например, две легких цепи и две тяжелых цепи, и при этом первый связывающий (поли) пептид слит или с легкой или с тяжелой цепью указанного антитела, полученная

5 связывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением может включать указанное одно антитело и два первых связывающих (поли)пептида, слитых с каждой одной из двух цепей антитела (или легкой или тяжелой). Примеры таких связывающих молекул по изобретению описаны в прилагаемых примерах и показаны ниже, например, на фигуре 8.

10 Как показано в прилагаемых примерах, связывающая молекула, определенная выше (также называемая в данном описании COVA208), проявляет превосходную противоопухолевую активность в отношении опухолей, экспрессирующих HER2. Противоопухолевая активность, наблюдаемая с использованием связывающей молекулы по изобретению, существенно выше, чем ингибирование активности опухоли, полученное

15 путем комбинированного связывания двух моноспецифических белков, при этом первый моноспецифический связывающий белок представляет собой бивалентный образованный из Fyn SH3 полипептид, имеющий SEQ ID NO: 153 (т.е., Fc-гибрид C12 (SEQ ID NO: 1)), и второй моноспецифический связывающий белок представляет собой анти-HE112 антитело 1, при этом тяжелая цепь антитела состоит из аминокислотной

20 последовательности SEQ ID NO: 154, и легкая цепь антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающую молекулу по изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением, термин «молекула нуклеиновой кислоты»,

25 в данном описании также называемая «полинуклеотидом» или «нуклеотидной последовательностью», определяет линейную молекулярную цепь, состоящую из более 30 нуклеотидов. «Молекулы нуклеиновой кислоты», в соответствии с настоящим изобретением, включают ДНК, такую как, например, геномная ДНК, и РНК, например, мРНК. Также включены молекулы, имитирующие нуклеиновую кислоту, известные в

30 технике, такие как, например, синтетические или полусинтетические производные ДНК или РНК, и смешанные полимеры. Такие имитирующие нуклеиновую кислоту молекулы или производные нуклеиновой кислоты согласно изобретению включают фосфоротионатнуклеиновую кислоту, фосфоамидаатнуклеиновую кислоту, 2'-О-метоксиэтилрибонуклеиновую кислоту, морфолинонуклеиновую кислоту,

35 гекситолнуклеиновую кислоту (HNA) и замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA) (см. Braasch and Corey, Chem. Biol., 2001, 8: 1). LNA представляет собой производное РНК, в котором образован рибозный цикл за счет метиленовой связи между 2'-кислородом и 4'-углеродом. Они могут содержать дополнительные основания неприродных или деривативных нуклеотидов, что будет очевидно для специалистов в данной области

40 техники.

Следует иметь в виду, что связывающая молекула по настоящему изобретению может быть кодирована одной молекулой нуклеиновой кислоты или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими части связывающей молекулы, такие как, например, отдельные связывающие (поли)пептиды или различные цепи антитела. После

45 экспрессии таких молекул нуклеиновой кислоты они образуют связывающую молекулу по изобретению через нековалентные связи, такие как, например, водородные связи, ионные связи, ван дер-ваальсовы силы или гидрофобные взаимодействия, или через ковалентные связи, такие как, например, дисульфидные связи.

Например, когда связывающая молекула представляет собой образованный из Fyn SH3 полипептид, связанный с фрагментом антитела, включающим, например, только scFv-фрагмент, или dAb, тогда связывающая молекула может быть кодирована одной молекулой нуклеиновой кислоты. Когда связывающая молекула включает образованный из Fyn SH3 полипептид, связанный с полноразмерным антителом, как показано в прилагаемых примерах, первая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать образованный из Fyn SH3 полипептид и цепь антитела, с которой связан образованный из Fyn SH3 полипептид, и вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать остальную цепь антитела. С другой стороны, одна молекула нуклеиновой кислоты также может кодировать такие отдельные полипептидные цепи, например, когда кодирующие нуклеотидные последовательности включены в вектор, включающий соответствующие регуляторные элементы для каждой кодирующей последовательности. Следует иметь в виду, что когда для кодирования связывающей молекулы по изобретению используют несколько нуклеотидных последовательностей (или векторов, как описано ниже), может потребоваться приведение полученных экспрессированных полипептидов в контакт для того, чтобы образовать связывающую молекулу по изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением термин «молекула нуклеиновой кислоты по изобретению» охватывает как одну молекулу нуклеиновой кислоты, так и несколько молекул нуклеиновой кислоты, до тех пор, пока все компоненты связывающей молекулы по изобретению кодируются таким образом.

Настоящее изобретение также относится к вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

Предпочтительно вектор представляет собой плазмиду, космиду, вирус, бактериофаг или другой вектор, обычно используемый, например, в генной инженерии.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть встроена в некоторые коммерчески доступные векторы. Неограничительные примеры включают прокариотические плазмидные векторы, такие как pQE-12, ряда pUC, pBluescript (Stratagene), ряд экспрессирующих векторов pET (Novagen) или pCRTOP0 (Invitrogen), лямбда gt11, pJOE, ряда pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 и векторы, совместимые с экспрессией в клетках млекопитающих, подобные векторной системе E-027 pCAG Kosak-Cherry (L45a), pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, вектор pcDV1, экспрессирующий кДНК Okayama-Berg (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pcDNA3.1, pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) и pCIneo (Promega). Примеры плазмидных векторов, подходящих для *Pichia pastoris*, включают, например, плазмиды pA0815, pPIC9K и pPIC3.5K (все Invitrogen). Другим вектором, подходящим для экспрессии белков в эмбрионах *Xenopus*, эмбрионах полосатого данио, а также клетках самых разных млекопитающих и птиц, является многоцелевой экспрессирующий вектор pCS2+.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, упомянутая выше, также может быть встроена в векторы так, что образуется слитый продукт трансляции с другой молекулой нуклеиновой кислоты. Другие молекулы нуклеиновой кислоты могут, например, кодировать белок, который улучшает растворимость и/или облегчает очистку связывающей молекулы, кодированной молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, или бежа, представляющего интерес, что должно наблюдаться с помощью флуоресцентного изображения. Неограничительные примеры таких векторов включают

pET32, pET41, pET43. Векторы также могут содержать дополнительный экспрессируемый полинуклеотид, кодирующий один или несколько шаперонов, для облегчения правильной укладки бежа. Подходящие бактериальные экспрессирующие хозяева включают, например, штаммы, полученные из TGI, BL21 (такие как BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21 (DE3)PRARE) или Rosettaa.

В отношении методов модификации векторов см. Sambrook and Russel, 2001. Как правило, векторы могут содержать один или несколько ориджинов репликации (ori) и систем наследования для клонирования или экспрессии, один или несколько маркеров селекции у хозяина, например, устойчивость к антибиотикам, и одну или несколько экспрессирующих кассет. Подходящие ориджины репликации включают, например, ориджины репликации Col E1, вируса SV40 и M 13.

Кодирующие последовательности, встроенные в вектор, можно, например, синтезировать стандартными методами или выделить из природных источников. Цитирование кодирующих последовательностей к транскрипционным регуляторным элементам и/или другим аминокислотным кодирующим последовательностям можно выполнить с использованием установленных методов. Такие регуляторные последовательности хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, без ограничения, регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции, внутренние рибосомные сайты проникновения (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (2001), 1471-1476) и, необязательно, регуляторные элементы, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта.

Неограничительные примеры регуляторных элементов, обеспечивающих инициацию транскрипции, включают кодон инициации трансляции, энхансеры, такие как, например, SV40-энхансер, инсуляторы и/или промоторы, такие как, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV (вируса саркомы Рауса), промотор lacZ, промотор куриного бета-актина, промотор CAG (комбинация промотора куриного бета-актина и немедленнораннего энхансера цитомегаловируса), промотор gail0, промотор фактора элонгации 1 α человека, промотор AOX1, промотор GAL1, промотор CaM-киназы, промотор lac, trp или tac, промотор lacUV5, многогранный промотор многоядерного вируса гипергидроза autographa californica (AcMNPV) или интрон глобина в клетках млекопитающих и других животных. Промотор lac является типичным индуцируемым промотором, применимым для прокариотических клеток, который можно индуцировать с использованием аналога лактозы изопропилтиол-b-D-галактозида («IPTG»). Неограничительные примеры регуляторных элементов, обеспечивающих терминацию транскрипции, включают сайт V40-поли-A, сайт tk-поли-A или SV40, lacZ или сигналы многогранного полиаденилирования AcMNPV, которые должны быть включены после нуклеотидной последовательности по изобретению. Дополнительные регуляторные элементы могут включать энхансеры трансляции, последовательности Козак и вставочные последовательности, фланкированные донорскими и акцепторными участками сплайсинга РНК, нуклеотидные последовательности, кодирующие сигналы секреции, или, в зависимости от используемой экспрессирующей системы, сигнальные последовательности, способные направлять экспрессированный полипептид в клеточный компартмент. Например, может быть включена N-концевая фланкирующая последовательность или «лидерная последовательность», которую в технике также называют «сигнальным пептидом». Специалист может выбрать лидерные последовательности без особых затруднений. Лидерную последовательность предпочтительно используют для экспрессии любой цепи антитела (включая легкую цепь, тяжелую цепь) или домена, но далее она не

требуется в экспрессированной зрелой конструкции. Более того, также могут быть включены элементы, такие как ориджин репликации, ген устойчивости к лекарственным средствам, регуляторы (как часть индуцируемого промотора).

Экспрессирующий вектор по изобретению способен управлять репликацией и экспрессией молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению и кодируемой ею связывающей молекулы.

Котрансфекция с селектируемым маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин, гигромицин, дает возможность идентификации и изоляции трансфицированных клеток.

Трансфицированную нуклеиновую кислоту можно также амплифицировать для экспрессии больших количеств кодированной связывающей молекулы. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) применим для разработки клеточных линий, которые несут несколько сотен или даже несколько тысяч копий гена, представляющего интерес. Другим применимым маркером селекции является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy et al., 1991; Bebbington et al., 1992). С использованием таких маркеров клетки выращивают в избирательной среде, и отбирают клетки с самой высокой устойчивостью.

Экспрессирующие векторы будут предпочтительно включать, по меньшей мере, один селектируемый маркер. Такие маркеры включают дигидрофолатредуктазу, G418 или устойчивость к неомицину для эукариотических клеточных культур и гены устойчивости к тетрациклину, канамицину или ампициллину для культивирования в *E. coli* или других бактериях.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть созданы таким образом, что возможно прямое введение их в клетки или их создают такими, чтобы их можно было вводить в клетки посредством электропорации (с использованием, например, Multiporator (Eppendorf) или Genepulser (BioRad)), PEI (Polysciences Inc. Warrington, Eppelheim), Ca²⁺-опосредуемой трансфекции или с использованием липосом (например, "липофектамин" (Invitrogen)), нелипосомных соединений (например, "Fugene" (Roche)), липосом, фаговых векторов или вирусных векторов (например, аденовирусных, ретровирусных, лентивирусных). Кроме того, также можно использовать бакуловирусы или системы на основе вируса коровьей оспы или вируса леса Семлики в качестве вектора в эукариотической экспрессирующей системе для молекул нуклеиновой кислоты по изобретению. Экспрессирующие векторы, полученные из таких вирусов, как ретровирусы, вирус осповакцины, аденоассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, можно использовать для доставки молекул нуклеиновой кислоты или вектора в популяцию клеток-мишеней. Способы, которые хорошо известны специалистам в этой области техники, можно использовать для конструирования рекомбинантных вирусных векторов; см., например, методы, описанные в Sambrook, 2001, и Ausubel, 2001.

Следует иметь в виду, что связывающая молекула по изобретению кодирована несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, и указанные несколько молекул нуклеиновой кислоты могут быть заключены в один или в несколько векторов. Термин «вектор по изобретению» охватывает как один вектор, так и несколько векторов до тех пор, пока все компоненты связывающей молекулы по изобретению кодированы таким образом.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину или хозяину, не являющемуся человеком, трансформированному вектором по изобретению.

Указанный хозяин или клетка-хозяин могут быть получены путем введения вектора по изобретению в хозяина или клетку-хозяина, которые после их наличия опосредуют экспрессию связывающей молекулы, кодированной вектором.

В соответствии с настоящим изобретением хозяин может представлять собой трансгенное не являющееся человеком животное, трансфицированное с помощью и/или экспрессирующее вектор по настоящему изобретению. В предпочтительном воплощении трансгенное животное представляет собой млекопитающее, например

5 хомяка, корову, кошку, свинью, собаку или лошадь.

В предпочтительном воплощении хозяин представляет собой клетку, такую как изолированная клетка, которая может являться частью клеточной культуры.

Подходящие прокариотические клетки-хозяева включают, например, бактерии родов *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*. Подходящие эукариотические

10 клетки-хозяева включают, например, клетки грибов, среди прочих, дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, или клетки насекомых, таких как дрозофила S2 и *Spodoptera Sf9*, и клетки растений, а также клетки млекопитающих. Подходящие среды и условия для культивирования для вышеописанных клеток-хозяев известны в данной области техники.

15 Клетки-хозяева млекопитающих включают, без ограничения, клетки человека Hela, HEK293, H9 и клетки Юрката, мышинные клетки NIH3T3 и C127, Cos1, Cos7 и CV1, перепелиные клетки QC1, мышинные N-клетки, клетки яичника китайского хомяка (СНО) и клетки меланомы Боуэса. С другой стороны, связывающая молекула по изобретению может быть экспрессирована в устойчивой клеточной линии, которая

20 содержит генную конструкцию, охватывающую молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению или вектор по изобретению, интегрированные в хромосому.

В другом предпочтительном воплощении указанная клетка представляет собой первичную клетку или первичную клеточную линию. Первичные клетки представляют собой клетки, которые получены непосредственно из организма. Подходящими

25 первичными клетками являются, например, фибробласты эмбриона мыши, первичные гепатоциты, кардиомиоциты и нейроны мыши, а также мышечные стволовые клетки (клетки-спутники) мыши и полученные из них устойчивые клеточные линии.

Настоящее изобретение также относится к способу получения связывающей молекулы по изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина по изобретению в

30 подходящих условиях и выделение связывающей молекулы, продуцированной указанной клеткой-хозяином.

Подходящие условия для культивирования прокариотических или эукариотических хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, подходящими условиями для культивирования бактерий является выращивание их при

35 снабжении кислородом в среде Лурия-Бертани (LB). Для того, чтобы повысить выход и растворимость продукта экспрессии, среду можно забуферить или снабдить подходящими добавками, известными для усиления или облегчения того и другого. *E. coli* можно культивировать при температуре от 4 до примерно 37°C, точная температура или последовательность температур зависит от молекулы, которую сверхэкспрессируют.

40 Вообще специалист также понимает, что такие условия можно адаптировать к потребностям хозяина и требованиям для экспрессируемой связывающей молекулы. В случае, когда молекулы нуклеиновой кислоты изобретения находятся под контролем индуцируемого промотора в векторе, присутствующем в клетке-хозяине, экспрессия связывающей молекулы может быть индуцирована добавлением соответствующего

45 индуцирующего агента. Подходящие протоколы и стратегии экспрессии известны специалистам.

В зависимости от типа клетки и ее специфических требований культуры клеток млекопитающих можно получить, например, на среде RPMI или DMEM, содержащей

10% (об./об.) FCS, 2 mM L-глутамина и 100 Е/мл пенициллина/стрептомицина. Клетки можно выдерживать при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, насыщенной водой.

Подходящими средами для культуры клеток насекомых являются, например, среда TNM + 10% FCS, или среда SF900. Клетки насекомых обычно выращивают при 27°C в виде адгезионной культуры или суспензионной культуры.

Подходящие протоколы экспрессии для эукариотических клеток известны специалистам, и их можно найти, например, в Sambrook, 2001, loc cit.

Способы выделения полученной связывающей молекулы хорошо известны в технике и включают, без ограничения, стадии способа, такие как ионообменная хроматография, гель-хроматография (эксклюзионная хроматография), аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ВЭЖХ с обращенной фазой, диск-гель-электрофорез или иммунопреципитация, см., например, Sambrook, 2001, loc cit.

Настоящее изобретение также относится к композиции, включающей, по меньшей мере, один компонент из (i) связывающей молекулы по изобретению, (ii) молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, (iii) вектора по изобретению или (v) клетки-хозяина по изобретению.

Термин «композиция», используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к композиции, которая включает, по меньшей мере, один из указанных компонентов. Она также необязательно может включать молекулы, способные изменять характеристики соединений по изобретению посредством, например, стабилизации, модуляции и/или усиления их функции. Композиция может находиться в твердой или жидкой форме и может находиться, среди прочего, в форме (а) порошка(ов), (а) таблетки (таблеток) или (а) раствора(ов).

В предпочтительном воплощении композиция представляет собой фармацевтическую композицию, также включающую, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с настоящим изобретением термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции для введения пациенту, предпочтительно, пациенту человеку. Фармацевтическая композиция по изобретению включает соединения, указанные выше. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать, необязательно и дополнительно, фармацевтически приемлемый носитель.

«Фармацевтически приемлемым носителем» обозначается нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство любого типа. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в технике и включают растворы хлорида натрия, забуференные фосфатом растворы хлорида натрия, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих веществ, стерильные растворы, органические растворители и т.д.. Предпочтительно носитель представляет собой парентеральный носитель, предпочтительнее, раствор, который изотоничен с кровью реципиента. Термин «парентеральный», используемый в данном описании, относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, интраперитонеальную, интратермальную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию. Носитель соответственно содержит небольшие количества добавок, таких как вещества, которые усиливают изотоничность и химическую устойчивость. Такие материалы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферирующие вещества, такие как фосфаты, цитраты, сукцинаты, уксусную кислоту и другие органические кислоты или их соли; антиоксиданты, такие как аскорбиновая

кислота; низкомолекулярные (менее примерно десяти остатков) (поли)пептиды, например, полиаргинин или трипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или также иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразователи, такие как ЭДТК; спирты-сахара, такие как маннит или сорбит; противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, полуксамеры или ПЭГ.

Композиции, включающие такие носители, могут быть получены известными традиционными способами. Как правило, композиции получают, осуществляя равномерный и тщательный контакт компонентов фармацевтической композиции с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или теми и другими. Затем, при необходимости, продукту придают форму нужного препарата.

Такие фармацевтические композиции можно вводить субъекту в соответствующей дозе. Схема приема будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в медицине, дозировки для любого одного пациента зависят от многих факторов, в том числе, размера пациента, площади поверхности тела, возраста, определенного вводимого соединения, пола, времени и способа введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых параллельно.

Терапевтически эффективное количество для данной ситуации будет легко определяться простым экспериментом, что входит в компетенцию рядового клинициста или врача. Фармацевтическая композиция может вводиться однократно или регулярно в течение продолжительного периода времени. Как правило, введение фармацевтической композиции должно находиться в интервале, например, от 10 мкг/кг массы тела до 2 г/кг массы тела в однократной дозе. Однако более предпочтительная дозировка может находиться в интервале от 100 мкг/кг до 1,5 г/кг массы тела, даже предпочтительнее, от 1 мг/кг до 1 г/кг массы тела, и даже еще предпочтительнее, от 5 мг/кг до 500 мг/кг массы тела в однократной дозе.

Введение фармацевтических композиций по изобретению можно осуществлять различными путями, например, путем внутривенного, интраперитонеального, подкожного, внутримышечного, интрадермального, интраназального или интрабронхиального введения.

Соединения фармацевтической композиции, используемой для терапевтического введения, должны быть стерильными. Стерильность легко достигается фильтрацией через мембраны для стерильной фильтрации (например, мембраны 0,2 мкм).

Компоненты фармацевтической композиции обычно будут храниться в одно- или многодозовых контейнерах, например, запаянных ампулах или флаконах, в виде водного раствора или в виде лиофилизованного препарата для восстановления. Как пример лиофилизованного препарата, 10-мл флаконы заполняют 5 мл стерильно фильтрованного 1% (мас./об.) водного раствора, и полученную смесь лиофилируют. Раствор для инфузии получают восстановлением лиофилизованного(ых) соединения(й) с использованием бактериостатической воды для инъекции. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные средства, антиоксиданты, хелатообразователи и инертные газы и т.п.. Фармацевтическая композиция может включать дополнительные средства, в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция может применяться, в частности, для лечения

опухолей, как раскрывается ниже.

В другом предпочтительном воплощении композиция по изобретению представляет собой диагностическую композицию.

- В соответствии с настоящим изобретением термин «диагностическая композиция»
 5 относится к композициям для диагностирования отдельных пациентов на их возможную реакцию на фармацевтические композиции по изобретению или излечимость фармацевтическими композициями по изобретению. Диагностическая композиция по изобретению включает соединения, указанные выше. Диагностическая композиция также может включать соответствующее(ие) буферное(ые) вещество(а) и т.д..
 10 Диагностическая композиция может быть упакована в контейнер или несколько контейнеров.

Настоящее изобретение также относится к связывающей молекуле по изобретению, молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению или вектору по изобретению для применения при лечении опухолей.

- Термин «опухоль» в соответствии с настоящим изобретением относится к классу заболеваний или расстройств, характеризующихся неконтролируемым делением клеток, и охватывает все типы опухолей, такие как, например, раковые опухоли и доброкачественные опухоли, а также солидные опухоли и несолидные опухоли. Раковые опухоли дополнительно характеризуются способностью таких опухолей к
 15 распространению или путем непосредственного прорастания в соседние ткани через инвазию или путем имплантации в отдаленные места путем метастазирования, когда опухолевые клетки переносятся кровотоком или лимфатической системой.

- Предпочтительно опухоль представляет собой раковую опухоль, выбранную из группы, включающей рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак
 25 слюнных желез, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почек, рак легких, рак, задевающий верхний отдел желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, карциному головы и шеи, рак шейки матки, глиобластому, злокачественный асцит, лимфомы и лейкозы.

- 30 Все типы онкозаболеваний, описанные в данном описании, хорошо известны специалистам и определяются согласно соответствующей области техники и уровню знаний специалистов.

Описание чертежей

- Фигура 1. Эксперименты с FACS по связыванию с использованием клеток B-474,
 35 сверхэкспрессирующих HER2.

- (А) Связывание образованных из Fyn SH3 полипептидов C12 (SEQ ID NO: 1) и G10 (SEQ ID NO: 2) на HER2 с предварительной блокировкой или без нее эпитопа анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1; при этом тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и легкая цепь имеет аминокислотную
 40 последовательность SEQ ID NO: 155; примеры молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую и легкую цепь, показаны в SEQ ID NO: 156 и 166) и анти-HER2 антитела 2 (анти-HER2 mAb 2; при этом тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163; примеры молекул нуклеиновой кислоты,
 45 кодирующей тяжелую и легкую цепь, показаны в SEQ ID NO: 168 и 169). PBS - забуференный фосфатом физиологический раствор представляет собой отрицательный контроль.

(В) Связывание биотинилированного анти-HER2 антитела 1 и биотинилированного

анти-НЕК2 антитела 2 (биотинилированные антитела указываются аббревиатурой «bt») с предварительной блокировкой или без нее эпитопа анти-HER2 антитела 1 и анти-HER2 антитела 2. PBS - забуференный фосфатом физиологический раствор представляет собой отрицательный контроль.

5 Фигура 2. Анализы *in vitro* пролиферации со сверхэкспрессирующей HER2 клеточной линией рака желудка NCI-N87.

Образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1) сливают с Fc-частью человеческого IgG для создания моноспецифического бивалентного белка, названного Fc-C12 (SEQ ID NO: 153). Смесь комбинации финомера C12-Fc с анти-HER2 антителом 1 (анти-HER2 mAb 1) (показана на фиг. 2A) и с анти-HER2 антителом 2 (анти-HER2 mAb 2) (показана на фиг. 2C) не снижает скорость пролиферации клеток NCI-N87 более эффективно, чем соответствующие отдельные анти-HER2 антитела. Однако антипролиферативная активность связывающих молекул COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) (показаны на фиг. 2B) и COVA210 (SEQ ID NO: 160 и 161; пример молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 161, показан в SEQ ID NO: 170) (фиг. 2D) выше, чем активность соответствующего немодифицированного антитела. COVA208 состоит из слияния C12 (SEQ ID NO: 1) по N-концу с легкой цепью антитела 1 (SEQ ID NO: 154 и 155), и COVA210 состоит из слияния C12 (SEQ ID NO: 1) по N-концу с легкой цепью антитела 2 (SEQ ID NO: 160 и 163), см. также фигуру 8.

20 Фигура 3. Антипролиферативная активность гибридов финомер-антитело изменяется в зависимости от относительной ориентации финомера и сайта связывания антитела. Антипролиферативная активность различных слитых белков финомер-антитело в клеточном анализе на пролиферацию с клетками рака желудка NCI-N87 показывает изменения (A) и (B), и COVA208 показывает наилучшее антипролиферативное действие на такой клеточной линии (фиг. 3B). Максимальное действие показано в таблицах и дается в проценте жизнеспособности. COVA201 (SEQ ID NO: 156 и 155), COVA202 (SEQ ID NO: 154 и 157), COVA207 (SEQ ID NO: 158 и 155) и COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) все представляют собой слитые белки образованного из Fyn SH3 полипептида C12 (SEQ ID NO: 1) и анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1) (SEQ ID NO: 154 и 155). COVA201 состоит из слияния по C-концу с тяжелой цепью, COV202 представляет собой слияние по C-концу с легкой цепью, COVA207 состоит из слияния по N-концу с тяжелой цепью, и COVA208 представляет собой слияние по N-концу с легкой цепью, см. также фигуру 8.

35 Фигура 4. Антипролиферативную активность COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) (слияние финомера C12 по N-концу с легкой цепью анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1, SEQ ID NO: 154 и 155) определяют в клеточном анализе с клеточной линией рака молочной железы BT-474, сверхэкспрессирующей HER2. COVA208 показывает превосходную антипролиферативную активность по сравнению с немодифицированными антителами.

40 Фигура 5 отображает исследование на животных на мышинной модели с ксенотрансплататом рака желудка NCI-N87. Клетки рака желудка NCI-N87 инокулируют подкожно голым мышам CD1 (n=6 на группу обработки). Когда опухоль достигает размера примерно 140 мм³, животных обрабатывают ударной дозой 30 мг/кг COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159), анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) или плацебо (PBS). Обработку продолжают в течение четырех недель инъекциями *i.p.* (15 мг/кг) (показано стрелками), и измеряют размер опухолей штангенциркулем. Находят, что COVA208 подавляет рост опухоли лучше, чем моноспецифическое анти-HER2 антитело 1 или плацебо (PBS). Приводится средний объем опухоли у 6 мышей

(относительно дня 0, когда обработка начиналась) \pm среднеквадратическая ошибка (SEM).

Фигура 6. Концентрации в сыворотке COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) и анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) в различные моменты времени после однократной i.v. инъекции мышам C57 B1/6. Шесть последних точек используют для вычисления конечного времени полужизни 247 час (COVA208) и 187 час (анти-HER2 антитело 1). Строят график зависимости средней концентрации в сыворотке от времени, величины ошибки представляют стандартные отклонения (SD).

Фигура 7. SDS PAGE COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) и анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) (вверху) и эксклюзионные хроматограммы COVA208 после очистки и после хранения в течение 1 и 2 месяцев при 4°C (внизу). Очевидно, что COVA208 не образует никаких агрегатов.

Фигура 8. Схематическое отображение различных форматов связывающих молекул, которые связываются с двумя различными эпитопами антигена. COVA201 (SEQ ID NO: 156 и 155), COVA202 (SEQ ID NO: 154 и 157), COVA207 (SEQ ID NO: 158 и 155) и COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) все представляют собой слитые белки образованного из Fyn SH3 полипептида C12 (SEQ ID NO: 1) и анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1) (SEQ ID NO: 154 и 155). COVA201 состоит из слияния по С-концу с тяжелой цепью, COVA202 представляет собой слияние по С-концу с легкой цепью, COVA207 состоит из слияния по N-концу с тяжелой цепью, и COVA208 представляет собой слияние по N-концу с легкой цепью. COVA210 (SEQ ID NO: 160 и 161) состоит из слияния C12 (SEQ ID NO: 1) по N-концу с легкой цепью антитела 2 (SEQ ID NO: 160 и 163).

Фигура 9. Анализы *in vitro* пролиферации с клеточными линиями, сверхэкспрессирующими HER2. COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) подавляет рост клеток OE19 (фиг. 9A) и Calu-3 (фиг. 9B) более эффективно, чем анти-HER2 антитело 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)). Фигура 9C суммирует результаты *in vitro* анализов пролиферации, выполненных на 10 различных клеточных линиях, для каждой на график нанесен максимальный уровень ингибирования. Соответствующие точки для COVA208 и анти-HER2 антитела 1 соединены для облегчения сравнения между двумя соединениями.

COVA208 показывает улучшенное подавление роста клеток по сравнению с анти-HER2 антителом 1 на всех 10 клеточных линиях.

Фигура 10. COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) способен индуцировать апоптоз, что определяют по активности каспазы-3/7 (фиг. 10A) и по окрашиванию TUNEL (фиг. 10B). Анти-HER2 антитело 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) не увеличивает ни активность каспазы-3/7, ни фракцию TUNEL-положительных клеток, что указывает, что способность индуцировать апоптоз уникальна для COVA208. В качестве положительного контроля используют стауроспорин. Величина ошибки на фиг. 10A показывает стандартное отклонение при трехкратном повторе.

Фигура 11. COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) ингибирует лигандзависимую активацию передачи сигнала HER2 на клетках MCF-7 (левая часть), а также лиганднезависимую активацию передачи сигнала HER2 на клетках NCI-N87 (правая часть). Анти-HER2 антитело 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) ингибирует передачу сигнала только на клетках MCF-7, в то время как анти-HER2 антитело 2 (анти-HER2 mAb 2 (SEQ ID NO: 160 и 163)) активно только на клетках NCI-N87. В качестве нагрузочного контроля служит винкулин.

Фигура 12. COVA208 интернализуется клетками NCI-N87. После окрашивания поверхности и последующих 5 час инкубации 52% COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159)

обнаруживают в сферических образованиях в цитозоле, что определяют из изображений конфокального лазерного сканирования, анализированных с помощью программы Imaris. Окрашивание анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) остается преимущественно мембранассоциированным, и только 9% окрашивания локализовано в цитозольных сферических образованиях.

Фигура 13 отображает исследование на животных на мышинной модели с ксенотрансплантатом рака молочной железы KPL-4. Клетки рака молочной железы KPL-4 инокулируют подкожно мышам SCID с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров (n=8 на группу обработки). Когда опухоли достигают размера

примерно 70 мм³, животных обрабатывают ударной дозой 30 мг/кг COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159), анти-HER2 антитела 1 (анти-HER2 mAb 1 (SEQ ID NO: 154 и 155)) или плацебо (PBS). Обработку продолжают в течение четырех недель инъекциями i.p. (15 мг/кг) (показано стрелками), и измеряют размер опухолей штангенциркулем. Находят, что COVA208 подавляет рост опухоли значительно лучше, чем моноспецифическое анти-HER2 антитело 1 или плацебо (PBS). Приводится средний объем опухоли у 8 мышей \pm среднеквадратическая ошибка (SEM).

Изобретение иллюстрируют примеры.

Пример 1. Образованные из Fyn SH3 полипептиды связываются с HER2

Методы

1) Фаговый ELISA на рекомбинантном белке HER2

ДНК, кодирующую аминокислоты, показанные в SEQ ID NO: 9-121, клонируют в фагмидный вектор pHEN1, как описано для библиотеки Fyn SH3 в Grabulovski et al. (Grabulovski et al. (2007), JBC, 282, p. 3196-3204). Получение фагов выполняют согласно стандартным протоколам (Viti F. et al. (2000), Methods Enzymol., 326, 480-505).

Моноклональные бактериальные супернатанты, содержащие фаги, используют для ELISA: биотинилированный внеклеточный домен HER2, содержащий аминокислоты 23-652 полноразмерного бежа (закупают у Bender Medsystems или R&D как гибрид с человеческим Fc γ 1; биотинилирование выполняют сульфो-NHS-LC-биотином (Peirce) согласно инструкциям изготовителя), иммобилизуют в лунках, покрытых стрептавидином (StreptaWells, High Bind, Roche), и после блокировки 2% молоком (Rapilait, Migros, Швейцария) в PBS добавляют 20 мкл 10% молока в PBS и 80 мкл фаговых супернатантов. После инкубации в течение 1 часа несвязанные фаги отмывают, и связанные фаги детектируют конъюгатом анти-M13-HPR-антитела (GE Healthcare). Детекцию пероксидазной активности осуществляют, добавляя субстрат ВМ синий POD (Roche), и реакцию останавливают, добавляя 1 М H₂SO₄. Положительные на фаговый ELISA клоны проверяют фаговым ELISA на отсутствие перекрестной реактивности со стрептавидином (StreptaWells, High Bind, Roche) и человеческим IgG (Sigma).

Последовательность ДНК специфических связывающих факторов проверяют секвенированием ДНК.

2) Эксперимент FACS на клетках SKOV-3, сверхэкспрессирующих HER2

ДНК, кодирующую полипептиды, показанные в SEQ ID NO: 1-8 и SEQ ID NO: 122-152, субклонируют в бактериальный экспрессирующий вектор pQE12 так, что полученные конструкции содержат С-концевую мус-гексагистидиновую метку (SEQ ID NO: 162), как описано в Grabulovski et al. (Grabulovski et al. (2007), JBC, 282, p. 3196-3204). Полипептиды экспрессируют в цитозоле бактерий E. coli, и получают 1,8 мл осветленного лизата на мл исходной культуры. Смешивают 100 мкл осветленного лизата, содержащего полипептиды, со 100 мкл клеточной суспензии, содержащей

1,25×10⁵ клеток SKOV-3 в смеси PBS/1% FCS/0,2% азида натрия. После 60-мин инкубации на льду клетки промывают, и детектируют связанные последовательности с помощью 10 мкг/мл анти-тус мышиных антител 9E10 (Roche), и затем с помощью конъюгата антимышиный IgG-Alexa 488 (Invitrogen). Затем окрашенные клетки анализируют в анализаторе FACS. Последовательность ДНК специфических связывающих полипептидов проверяют секвенированием ДНК.

Результаты

Аминокислотные последовательности образованных из Fyn SH3 связывающих полипептидов представлены в SEQ ID NO: 1-152 в виде приложения в списке последовательностей.

Пример 2. Образованные из Fyn SH3 полипептиды связываются с другими эпитопами HER2, сравнение с анти-HER2 антителами

Методы

Последовательности ДНК, кодирующие образованные из Fyn SH3 клоны C12 (SEQ ID NO: 1) и G10 (SEQ ID NO: 2), субклонируют в бактериальный экспрессирующий вектор pQE12 так, что полученные конструкции содержат С-концевую тус-гексагистидиновую метку (SEQ ID NO: 162), и две конструкции экспрессируют и очищают с помощью гексагистидиновой метки, как описано в Grabulovski et al. (Grabulovski et al. (2007), JBC, 282, p. 3196-3204).

Тяжелые и легкие цепи (SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 155) anti-HER2 антитела 1 и анти-HER2 антитела 2 (SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 163) временно коэкспрессируют в клетках CHO. Антитела очищают от культурального супернатанта аффинной хроматографией на колонке MabSelect SuRe (GE healthcare).

Предварительно инкубируют 10⁵ клеток BT-474 (ATCC) с избытком 1 мкМ анти-HER2 антитела 1, анти-HER2 антитела 2 или PBS в течение 60 мин на льду. Затем к клеткам добавляют 300 нМ C12 или G10 плюс 20 нМ анти-тус мышиных антител 9E10 (Roche) без промывки от блокирующих антител. После 45-мин инкубации клетки промывают, и детектируют связанные комплексы C12/9E10 и G10/9E10 с помощью конъюгата антимышиный IgG-Alexa488. Клетки анализируют FACS. Связывание C12 и G10 с поверхностями клеток, заблокированных анти-HER2 антителом 1 или анти-HER2 антителом 2, сравнивают со связыванием с неблокированными клетками. Для того, чтобы проанализировать эффективность блокады эпитопов анти-HER2 антителом 1 и 2, к предварительно заблокированным клеткам добавляют 25 нМ биотинилированных антител (биотинилирование выполняют сульфо-NHS-LC-биотином (Pierce) согласно инструкциям изготовителя), и затем осуществляют детекцию с помощью конъюгата стрептавидин-аллофикоцианин.

Результаты

Результаты экспериментов показаны на фигуре 1. Предварительная блокировка любыми антителами радикально уменьшает связывание соответствующих биотинилированных антител, что показывает, что на стадии предварительной блокировки эффективно и специфически блокируются эпитопы двух различных антител (фигура 1B).

Связывание C12 и G10 не затрагивается предварительной блокировкой ни анти-HER2 антителом 1, ни анти-HER2 антителом 2, что показывает, что оба клон связываются с различными эпитопами для анти-HER2 антитела 1 и анти-HER2 антитела 2 (фигура 1A).

Пример 3. Связывающие молекулы по изобретению имеют более сильное антипролиферативное действие, чем комбинация отдельных связывающих белков

Имеющие целью HER2 связывающие молекулы с двумя различными специфичностями связывания создают путем слияния C12 через глицинсериновый линкер (Gly₄Ser)₃ с N-концом легкой цепи анти-HER2 антитела 1 (что приводит к белку, называемому COVA208) или анти-HER2 антитела 2 (что приводит к белку, называемому COVA210).

Методы

Анти-HER2 антитело 1 (SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 155), анти-HER2 антитело 2 (SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 163), COVA208 (SEQ ID NO: 154 и SEQ ID NO: 159) и COVA210 (SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161) временно коэксперсируют в клетках CHO и очищают от культурального супернатанта аффинной хроматографией на колонке MabSelect SuRe (GE healthcare). Двухвалентный моноспецифический формат клона C12 создают путем слияния через (Gly₄Ser)₃ с N-концом человеческого Fcγ1, что приводит к Fc-C12 (SEQ ID NO: 153). Белок экспрессируют и очищают так, как описано для анти-HER2 антитела 1, анти-HER2 антитела 2, COVA208 и COVA210.

Ингибирующее действие на рост конструкций, имеющих целью HER2, исследуют *in vitro* на линии опухолевых клеток NCI-N87 (закупают у ATCC). Такую линию клеток рака желудка человека, сверхэкспрессирующую HER2, выращивают в RPMI1640 (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco; инактивирована при 56°C в течение 45 мин). В 96-луночный планшет высевают 7000 клеток в 100 мкл среды для роста на лунку. После инкубации при 37°C/5% CO₂ в течение 24 час добавляют 20 мкл анти-HER2 конструкций Fc-C12, COVA208, COVA210, анти-HER2 антитело 1 или анти-HER2 антитело 2 или комбинации средств. Каждое условие выполняют при трехкратном повторе, и средства добавляют в трехкратных разведениях в концентрациях от 300 нМ до 0,015 нМ. В случае комбинаций каждое средство используют в указанной концентрации (например, 300 нМ Fc-C12 + 300 нМ анти-HER2 антитела 1). Через 5 суток жизнеспособность обработанных культур анализируют ХТТ (Roche). Реагент ХТТ превращается метаболически активными клетками в окрашенный продукт формазан, который поглощает свет с длиной волны 450 нм. Поглощение непосредственно коррелирует с числом живых клеток. Вычисляют жизнеспособность, %, относительно клеток, обработанных PBS, согласно формуле

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \left(\frac{OD_{\text{экспериментальные}} - OD_{\text{пустышка}}}{OD_{\text{необработанные}} - OD_{\text{пустышка}}} \right) \times 100.$$

Строят график средней жизнеспособности, %, против log₁₀ (концентрации), и полученные кривые зависимости от дозы анализируют нелинейной регрессией с помощью программы Prism с использованием трехпараметрического уравнения

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \text{наименьшее} + \frac{\text{наивысшее} - \text{наименьшее}}{1 + 10^{x - \text{LogIC}_{50}}}.$$

Результаты

Гибрид образованного из Fyn SH3 связывающего полипептида C12 с Fcγ1 человека по C-концу не оказывает какого-либо действия на жизнеспособность клеток (фигуры 2А и 2С). При добавлении в комбинации с анти-HER2 антителом 1 или анти-HER2 антителом 2 Fc-C12 существенно не повышает и не понижает активность указанных двух антител (фигуры 2А и 2С). Однако, когда клон C12 сливают по N-концу легкой цепи с анти-HER2 антителом 1 (COVA208) или анти-HER2 антителом 2 (COVA210) с образованием молекул с двумя различными специфичностями связывания для антигена, это усиливает антипролиферативное действие немодифицированных соответствующих

антител (фигуры 2B и 2D).

В итоге, такие результаты показывают, что молекулы COVA208 и COVA210 превосходят комбинацию отдельных моноспецифических связывающих белков.

Пример 4. Антипролиферативная активность гибридов анти-HER2 финомер-антитело различается в зависимости от относительной ориентации финомера и сайта связывания антитела

Несколько различных гибридов C12-антитело испытывают на их способность подавлять рост опухолевых клеток NCI-N87 для того, чтобы исследовать влияние места слияния, в котором образованная из Fyn SH3 последовательность присоединена к антителу.

Методы

COVA201 (SEQ ID NO: 156; SEQ ID NO: 155), COVA202 (SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 157), COVA207 (SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 155) и COVA208 (SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 159) все представляют собой гибриды C12-анти-HER2 антитело 1, в которых клон C12 слит по С-концу тяжелой цепи (COVA201), С-концу легкой цепи (COVA202), N-концу тяжелой цепи (COVA207) и N-концу легкой цепи (COVA208). Экспрессию и очистку выполняют так, как описано для COVA208 в примере 3. Анализ на подавление роста клеток выполняют на клетках NCI-N87 как описано в примере 3.

Результаты

Обнаружено, что различные форматы C12-анти-HER2 антитело 1 проявляют различную активность (фигуры 3A и 3B). COVA208 является наиболее эффективным при подавлении роста опухолевых клеток и снижает относительную жизнеспособность до 37%. COVA207 и COVA201 показывают промежуточную активность (жизнеспособность 52% и 61% соответственно), в то время как COVA202 менее активен и снижает жизнеспособность до 67%, но все еще лучше, чем анти-HER2 антитело 1 (жизнеспособность 81-82%). Такие результаты показывают, что гибриды одной пары образованной из Fyn SH3 последовательности и антитела имеют различную активность в зависимости от места слияния, и что слияние по N-концу легкой цепи C12 с анти-HER2 антителом 1 (=COVA208) показывает самую сильную антипролиферативную активность.

Пример 5. COVA208 подавляет рост клеток BT-474 с более высокой эффективностью, чем анти-HER2 антитело 1

Методы

Подавление роста клеток COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) сравнивают с анти-HER2 антителом 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) на клеточной линии рака молочной железы человека BT-474 (закупают у ATCC). Клеточная линия, сверхэкспрессирующая HER2, является одной из самых охарактеризованных моделей для исследования активности средств, имеющих целью HER2. Клетки BT-474 выращивают в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco) и 10 мкг/мл человеческого рекомбинантного инсулина. Анализ выполняют так, как описано в примере 3 для клеток NCI-N87.

Результаты

COVA208 показывает более хорошую антипролиферативную активность, чем анти-HER2 антитело 1 (фигура 4).

Пример 6. COVA208 подавляет рост NCI-N87 опухоли in vivo более эффективно, чем анти-HER2 антитело 1

COVA208 исследуют in vivo на подавление роста опухоли и сравнивают с анти-HER2 антителом 1.

Методы

Имплантируют 5×10^6 клеток опухоли желудка (ATCC; CRL-5822) s.c. атимическим голым мышам CD-1 (Charles River). Размеры опухоли и массу тела регистрируют три раза в неделю. Объем опухоли вычисляют по формуле $\text{объем} = (\text{ширина})^2 \times \text{длина} \times \pi /$

6. Когда средний размер опухоли достигает примерно 140 мм^3 , что бывает через 42 дня после инокуляции опухоли, мышей произвольно распределяют на три группы обработки, включающие по шесть мышей каждая, и начинают обработку. COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) и анти-HER2 антитело 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) вводят i.p. один раз в неделю в течение четырех недель (в целом пять инъекций). Первая (ударная) доза составляет 30 мг/кг, и каждая последующая (поддерживающая) доза составляет 15 мг/кг. Мышам в контрольной группе вводят PBS.

Результаты

Обработка анти-HER2 антителом 1 приводит только к слабому подавлению роста опухоли (фигура 5). COVA208 показывает улучшенное регулирование роста опухоли на протяжении обработки по сравнению с анти-HER2 антителом 1. В день 32 опухоли у мышей, обработанных COVA208, уменьшились в объеме на 8% по сравнению с начальным размером опухоли в начале обработки ($d=0$), в то время как мыши, обработанные анти-HER2 антителом 1, показывают увеличение объема на 88%.

Такой результат показывает, что COVA208 показывает значительную превосходную эффективность *in vivo* по сравнению с анти-HER2 антителом 1.

Пример 7. COVA208 показывает *in vivo* PK профиль, подобный антителу

Методы

Фармакокинетический профиль COVA208 исследуют на мышах C57BL/6 (Charles River) и сравнивают с анти-HER2 антителом 1. Трех мышам C57BL инъектируют i.v. 200 мкг COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) или анти-HER2 антитела 1 (SEQ ID NO: 154 и 155). Через 10 мин, 6, 24, 48, 96, 120, 144 и 168 часов отбирают кровь в покрытые ЭДТК микровете (Sarstedt), центрифугируют в течение 10 мин при 9300 g, и определяют ELISA сывороточные уровни COVA208 или анти-HER2 антитела 1. Темные титрационные микропланшеты maxisorp (Nunc) сенсibiliзируют 50 нМ ECD (Bender MedSystems). После блокировки 4% молоком (Rapilait, Migros, Швейцария) в PBS добавляют 40 мкл PBS и 10 мкл сыворотки соответствующего разведения. После инкубации в течение 1 часа лунки промывают PBS, и детектируют связанные COVA208 или анти-ШЖ2 антитело 1 с помощью конъюгата белок A-HRP (Sigma). Разрабатывают анализ с флуорегенным субстратом QuantaRed (Pierce), и измеряют интенсивность флуоресценции через 5-10 мин при 544 нм (возбуждение) и 590 нм (испускание). Сывороточные уровни COVA208 и анти-HER2 антитела 1 определяют с использованием стандартной кривой COVA208 и анти-HER2 антитела 1 (каждого разведенного до 333-0,5 нг/мл). Из концентраций COVA208 и анти-HER2 антитела 1, определенных в сыворотке в различные моменты времени, и полученного наклона к фазы элиминации (на графике в полулогарифмической шкале) вычисляют время полужизни с использованием формулы $t^{1/2} = \ln 2 / -k$.

Результаты

Как видно на фигуре 6, времена полужизни COVA208 и анти-HER2 антитела 1 при определении из фазы элиминации (бета-фаза, моменты времени 24 часа - 168 час) являются весьма схожими (247 и 187 час, соответственно). Такие данные показывают, что COVA208 имеет *in vivo* PK свойства, схожие с лекарственными средствами.

Пример 8. COVA208 устойчив и не образует агрегатов

Целостность и устойчивость COVA208 оценивают SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографией.

Методы

Очищенные COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) и anti-HER2 антитело 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) анализируют SDS-PAGE. В 4-12% гель Bis/Tris Novex в рабочем буфере 1x MOPS (Invitrogen) загружают 4 мкг белка или с уменьшенным или с неизменным

числом дисульфидных связей вместе с маркером молекулярной массы (RPN800e; GE healthcare). Полосы белка визуализируют окрашиванием кумасси. Профиль эксклюзионной хроматографии (SEC) COVA208 определяют сразу же после очистки, а также после хранения белка в PBS при 4°C в течение одного или двух месяцев. Загружают 100 мкл COVA208 в концентрации 1,75 мг/мл в колонку с супердексом 200 10/300 GL в PBS (GE healthcare) при скорости потока 0,5 мл/мин, и контролируют элюирование из колонки, считывая OD₂₈₀.

Результаты

Результаты SDS-PAGE и профили SEC COVA208 приводятся на фигуре 7. COVA208 при SDS-PAGE просматривается в ясно определяемых полосах с ожидаемой молекулярной массой (верхняя часть). Особый интерес представляет тот результат, что не имеется нативной легкой цепи, детектируемой в COVA208 (MW вблизи 30 кД), что указывает, что не происходит отщепление образованного из Fyn SH3 клона C12 от легкой цепи антитела.

COVA208, элюированный в одном главном пике, образует «колону» SEC с объемом удерживания 13,1 мл (наименьший). Anti-HER2 антитело 1 элюируется при 13,2 мл. Что наиболее важно, в препарате белка COVA208 не обнаруживается никаких агрегатов, которые могли бы элюироваться при примерно 8 мл. Профиль SEC COVA208 не изменяется после двух месяцев хранения при 4°C. Пик элюции остается узким, симметричным и появляется при том же объеме удерживания. Препарат белка остается свободным от агрегатов после 1 и 2 месяцев хранения. Это показывает, что COVA208 остается устойчивым в течение продолжительных периодов хранения при 4°C. В итоге, такие результаты подтверждают, что COVA208 представляет собой устойчивую монодисперсную молекулу с оптимальными биофизическими свойствами.

Пример 9. COVA208 имеет превосходную ингибирующую активность по сравнению с anti-HER2 антителом 1 на панели из десяти линий опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих HER2

Антипролиферативную активность COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) сравнивают с anti-HER2 антителом 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) на различных HER2-положительных клеточных линиях. Анализы с ХТТ выполняют по существу так, как описано в примере 3. Клеточные линии, используемые в данном эксперименте, и экспериментальные условия приводятся в таблице 1. Кривые дозовой зависимости подбирают к трехпараметрическому уравнению, как описано в примере 3, и максимальное подавление роста вычисляют по формуле

Максимальный уровень ингибирования (%) = 100% - наименьшее,

при этом переменную наименьшее определяют из нелинейной регрессии кривых дозовой зависимости с использованием формулы

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \text{наименьшее} + \frac{\text{наивысшее} - \text{наименьшее}}{1 + 10^{x - \text{LogIC}_{50}}}.$$

Результаты таких анализов показаны на фигуре 9. Фигуры 9А и 9В показывают кривые дозовой зависимости, полученные на клеточных линиях OE19 и Calu-3, соответственно. Фигура 9С представляет максимальное подавление роста, полученное на каждой клеточной линии с COVA208 и anti-HER2 антителом 1, включая результаты

на клеточных линиях NCI-N87 и BT-474, показанные на фигурах 2 и 4. COVA208 показывает улучшенную антипролиферативную активность по сравнению с анти-HER2 антителом 1 на 10 клеточных линиях.

Пример 10. COVA208 индуцирует апоптоз в клетках рака желудка NCI-N87

Способность COVA208 индуцировать апоптоз исследуют на клетках NCI-N87, анализируя ферментативную активность каспазы 3/7 и детектируя фрагментацию ДНК окрашиванием TUNEL.

Методы

Анализ каспазы 3/7. 45000 клеток NCI-N87 высевают в лунки 96-луночного титрационного микропланшета. На следующий день к клеткам добавляют 100 нМ анти-HER2 антитела 1 (SEQ ID NO: 154 и 155), COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) или PBS при трехкратном повторе. В качестве положительного контроля добавляют 1 мкМ стауроспорина. После двухсуточной инкубации определяют активность каспазы-3 и каспазы-7 с использованием набора fluorescence Apo-ONE® homogenous caspase-3/7 (Pierce).

Жизнеспособность обработанных культур анализируют ХТТ параллельно на планшетах для перепечатывания колоний микроорганизмов, и жизнеспособность, %, относительно образцов, обработанных PBS, вычисляют так, как описано в примере 3. Активность каспазы 3/7 делят на жизнеспособность, %, и получают нормализованную активность каспазы 3/7.

Анализ с TUNEL. В 6-луночных планшетах распределяют $0,8 \times 10^6$ клеток NCI-N87. На следующий день к клеткам добавляют 300 нМ анти-HER2 антитела 1 (SEQ ID NO: 154 и 155), COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) или PBS. В качестве положительного контроля добавляют 1 мкМ стауроспорина. После трехсуточной инкубации клетки отделяют, фиксируют в формалине, пропитывают 70% холодным этанолом, и 3'-гидроксильные концы ДНК метят комплексом флуоресцеин-дезоксидитрифосфат (FITC-dUTP) с использованием набора APO-DIRECT (Phoenix flow systems). Меченые клетки анализируют FACS, и определяют % TUNEL-положительных клеток с помощью воротного механизма в отношении популяции FITC-dUTP-положительных клеток.

Результаты

Результаты анализа каспазы 3/7 показаны на фигуре 10А. COVA208 приводит к повышенной активности каспазы 3/7, что показывает, что COVA208 индуцирует апоптоз клеток NCI-N87. Анти-HER2 антитело 1 не участвует в индуцированной активности каспазы 3/7.

Результаты анализа с TUNEL приводятся на фигуре 10В. COVA208 индуцирует фрагментацию ДНК в большинстве клеток, что также подтверждает, что COVA208 способен индуцировать апоптоз, в то время как анти-HER2 антитело 1 неспособно.

Пример 11. COVA208 ингибирует лигандзависимую и лиганднезависимую передачу сигнала, опосредуемую HER2

Активация HER2 передачи сигнала вперед ведет к фосфорилированию HER3, что приводит к активации метаболического пути PI3K-Akt-mTOR или к активации пути MARK/Erk. В линиях опухолевых клеток, которые отображают достаточно высокую плотность HER2 на поверхности, такие нижележащие пути (downstream) также могут быть активированы лигандами HER3, которые промотируют образование гетеродимера HER2-HER3 (лигандзависимая передача сигнала).

Для того чтобы исследовать действие COVA208 на передачу сигнала вперед HER2, сверхэкспрессирующие HER2 клетки NCI-N87 обрабатывают COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159), анти-HER2 антителом 1 (SEQ ID NO: 154 и 155), анти-HER2 антителом 2 (SEQ

ID NO: 160 и 163) и PBS, и анализируют клеточные лизаты на фосфорбелки иммуноблоттингом.

Анализ также выполняют на клетках MCF-7, слабоэкспрессирующих HER2, в которых фосфорилирование вперед запускается только после добавления лиганда HER3 герегулина-1β.

Методы

Клетки NCI-N87 (ATCC; CRL-5822) распределяют в 6-луночных культуральных планшетах в полной среде по 1×10^6 клеток в 3 мл на лунку. После инкубации в течение ночи при 37°C/5% CO₂ добавляют 40 мкг/мл анти-HER2 средств, и клетки инкубируют при 37°C/5% CO₂ в течение 72 час. Затем клетки лизируют на льду в буфере для лизиса клеток, содержащем 1% тритона-X, и смеси ингибитора протеазы и ингибитора фосфатазы (Roche Applied Sciences).

Клетки MCF-7 (ATCC; HTB-22) культивируют в MEM (Gibco) + 10% FBS (Gibco).

Клетки распределяют в 6-луночных культуральных планшетах по $0,5 \times 10^6$ клеток в 3 мл на лунку. После инкубации в течение ночи при 37°C/5% CO₂ клетки выдерживают в среде без сыворотки в течение 3 час, затем добавляют 40 мкг/мл анти-HER2 средств в течение 1 часа, в течение которого клетки выдерживают при 37°C/5% CO₂. Через 45 мин в течение 15 мин добавляют 2 нМ человеческий рекомбинантный герегулин-1β (R&D systwems). Затем клетки лизируют на льду в буфере для лизиса клеток, содержащем 1% тритона-X, и смеси ингибитора протеазы и ингибитора фосфатазы (Roche Applied Sciences).

Полные клеточные лизаты осветляют центрифугированием при 16000×g в течение 10 мин при 4°C, и в осветленных лизатах определяют концентрацию белка Брэдфорд-анализом (Bio-RAD). Отделяют 10 мкг белка на 4-12% бис-трис-гелях Novex® (Invitrogen), и переносят на PVDF мембрану.

Фосфобелки детектируют на PVDF мембране с помощью антител против pHER3^{Y1289} (Millipore), pAkt^{S473} (CST) или pErk1/2^{T202/Y204} (CST), затем вторичных конъюгированных с HRP антител (Jackson Immuno Research). Винкулин детектируют с помощью винкулинспецифических антител (Millipore), и он служит в качестве нагружающего контроля. Иммуноблотты проявляют хемилюминесцентным субстратом HRP с затравкой ECD (GE healthcare) и выставляют на рентгеновском снимке.

Результаты

Результаты данного эксперимента показаны на фигуре 11. В клетках MCF-7, в которых активация HER2 передачи сигнала вперед требует лиганды HER3, COVA208 и анти-HER2 антитело 1 - оба блокируют фосфорилирование HER3, Akt и Erk1/2 в равной степени хорошо, что показывает, что COVA208 сохраняет активность своего родительского антитела. Напротив, анти-HER2 антитело 2 не блокирует лигандзависимое фосфорилирование HER3, Akt или Erk1/2.

В клетках NCI-N87, где фосфорилирование белков передачи сигнала вперед HER2 происходит независимо от лигандов HER3, COVA208 эффективно блокирует фосфорилирование HER3, Akt или Erk1/2, в то время как анти-HER3 антитело 1 не блокирует фосфорилирование. Анти-HER2 антитело 2 также способно эффективно блокировать передачу сигнала HER2 в таких условиях. Такие результаты показывают, что COVA208 блокирует лигандзависимые, а также лиганднезависимые события передачи сигнала вперед HER2, в отличие от анти-HER2 антител 1 и 2, которые блокируют одно событие, но не блокируют другое.

Пример 12. COVA208 интернализуется клетками NCI-N87

Для того, чтобы исследовать промотирует ли COVA208 интернализацию рецептора HER2 *in vitro*, клетки NCI-N87 культивируют в присутствии COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159) или анти-HER2 антитела 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) с последующей фиксацией и пропитыванием клеток и последующей детекцией анти-HER2 средств при помощи вторичного антитела флуоресценции. Микроскопические изображения используют для оценки субклеточного распределения сигнала флуоресценции.

Методы

Клетки NCI-N87, выращенные в боковых лунках камеры Lab-Tek II CC², метят по поверхности на льду в течение 1 часа 100 нМ COVA208 или анти-HER2 антителом 1. Затем несвязанное анти-HER2 средство отмывают. В качестве положительного контроля в некоторые лунки добавляют 1 мкМ гелданамицин (ингибитор Hsp90), который вызывает быструю интернализацию HER2. Клетки переносят в условия 37°C/5% CO₂ на 0 час или 5 час для возможности интернализации, затем фиксируют формалином и пропитывают сапонином. Меченное Alexa488 антитело против человеческого IgG (Invitrogen) используют для детекции анти-HER2 средств на пропитанных клетках, и окрашивают ядра красителем Hoechst 33342. Окрашенные клетки анализируют на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP2-AOBS. Оптические срезы (z-стеки, d=0,2 мкм) собирают и анализируют три участка. Количество анти-HER2 средств, которые локализируются в отдельных точечных образованиях, определяют с помощью программы Imaris 7.4.0 (Bitplane) с использованием наружного инструмента для детектируемых сфероидных образований и выражают в процентах анти-HER2 средств, присутствующих в точках:

$$\% \text{ анти-HER2 средств в точках} = (\text{объем образований} / \text{объем всего окрашенного анти-HER2}) \times 100.$$

Результаты

После поверхностного мечения и перед инкубацией при 37°C COVA208 и анти-HER2 антитело 1 локализируются на клеточной мембране. После 5-часовой инкубации при 37°C COVA208 присутствует в отдельных точках в цитозоле, хотя клеточная мембрана только слабо окрашена. Напротив, анти-HER2 антитело 1 после 5-часовой инкубации при 37°C заключено в клеточной мембране, и в цитозоле обнаруживается только совсем мало точек. При совместной инкубации с гелданамицином анти-HER2 антитело 1 также обнаруживается в точках, и клеточная мембрана отрицательна для антитела. Такие результаты показывают, что, в отличие от анти-HER2 антитела 1, COVA208 быстро интернализуется в клетки NCI-N87.

Количественное определение % окрашиваний, появляющихся в точках, показано на фигуре 12. Большая часть COVA208 локализуется в точках, в то время как только небольшая часть анти-HER2 антитела 1 обнаруживается в точках.

Пример 13. COVA208 подавляет рост опухоли молочной железы KPL-4 *in vivo* более эффективно, чем анти-HER2 антитело 1

COVA208 исследуют *in vivo* на опухолях молочной железы KPL-4 на подавление роста и сравнивают с анти-HER2 антителом 1.

Методы

Клетки опухоли молочной железы человека KPL-4 (3×10^6 , Kurebayashi et al. (1999), Br. J. Cancer., 79; 707-717) имплантируют в жировой слой молочной железы самкам мышей с врожденным отсутствием клеток-киллеров SCID (Charles River). Размеры опухоли и массу регистрируют три раза в неделю. Объем опухоли вычисляют согласно

формуле объем = (масса)² × длина × π/6. Когда средний размер опухоли достигает 70 мм³, мышей произвольно распределяют в три группы обработки, включающие по восемь мышей каждая, и начинают обработку. COVA208 (SEQ ID NO: 154 и 159), анти-HER2 антитело 1 (SEQ ID NO: 154 и 155) или PBS вводят i.p. один раз в неделю в течение четырех недель (всего пять инъекций). Первая (ударная) доза составляет 30 мг/кг, и каждая последующая (поддерживающая) доза составляет 15 мг/кг.

Результаты

Обработка анти-HER2 антителом 1 приводит только к совсем небольшому подавлению роста опухоли (фигура 13). COVA208 показывает существенно лучшее регулирование роста опухоли. Такой результат также подтверждает, что COVA208 показывает существенно лучшую эффективность *in vivo* по сравнению с анти-HER2 антителом 1.

Пример 14. Определение эпитопа HER2, связанного образованным из Fyn SH3 полипептидом C12

Эпитоп, связанный образованным из Fyn SH3 полипептидом C12 (SEQ ID NO: 1) на HER2, идентифицируют подходом с аланинсканирующей мутацией, и выполняют это в Integral Molecular Inc. (Филадельфия, США). Библиотеку мутаций созданных с помощью shotgun мутагенеза создают так, как описано в Paes et al. (2009), J. Am. Chem. Soc, 131 (20): 6952-6954. Коротко, конструируют эукариотическую экспрессирующую плазмиду, кодирующую полноразмерный человеческий HER2, с С-концевой меткой эпитопа V5His. С использованием в качестве матрицы конструкции исходной кДНК, во внеклеточный домен HER2 вводят мутации аминокислот на аланин для сканирования (аминокислоты 23-652 SEQ ID NO: 171) с использованием мутагенеза на основе ПЦР. Остатки, которые уже представляют собой аланин в исходной конструкции, мутируют в метионин. Мутированные конструкции и исходную контрольную конструкцию HER2 экспрессируют в клетках НЕК-293Т. Через двадцать четыре часа после трансфекции клетки промывают PBS и фиксируют в 4% параформальдегиде. Клетки инкубируют с контрольным моноклональным анти-HER2 антителом (MAB1129, R&D Systems) или с образованным из Fyn SH3 клоном C12 (экспрессированным как N-концевой гибрид с Fc) в PBS с Ca²⁺/Mg²⁺ (PBS++) и 10% нормальной козьей сывороткой (NGS) в течение 1 часа. После двух промывок в PBS клетки инкубируют с козьими античеловеческими конъюгированными с Alexa Fluor 488 вторичными антителами (Jackson, West Grove, PA) в PBS++ и NGS в течение 1 часа с последующими 2 промывками в PBS. Проводят измерения в микропланшетах поточной цитометрией с использованием системы скрининга Intellicyt HTFC и осуществляют количественную оценку с использованием программы Forecyt (Intellicyt Corporation, Albuquerque, NM).

Обнаружено, что образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1) связывается с эпитопом HER2, который располагается в домене IHER2 (SEQ ID NO: 172). Подробнее, идентифицируют пять мутаций на аланин, которые приводят к заметно уменьшенному связыванию связывающих молекул, включающих образованный из Fyn SH3 полипептид C12 (SEQ ID NO: 1), в то время как связывание контрольных антител MAB1129 сохраняется. Такие мутации включают T166A, R188A, P197A, S202A and R203A при сравнении с последовательностью SEQ ID NO: 172. Иными словами, по меньшей мере, аминокислотные позиции T166, R188, P197, S202 and R203 домена I HER2 вовлекаются в связывание между образованным из Fyn SH3 полипептидом C12 и HER2.

Таблица 1. Экспрессирующие HER2 клеточные линии, используемые в анализах пролиферации *in vitro*, описанных на фигуре 9, и условия, применяемые в анализах пролиферации *in vitro*

Клеточная линия	Описание	Поставщик	Среда для выращивания	Условия анализа с ХТТ	
				Высеянные клетки/лунка	Время инкубации с анти-HER2 средствами
NCI-N87	карцинома желудка, метастазы в печень	ATCC	RPMI1640+10%BCA	7000	5 дней
BT-474	протоковый рак, молочная железа	ATCC	DMEM/F12+инсулин+10%BCA	7000	5 дней
KPL-4	молочная железа, злокачественный плевральный выпот	проф. Kurebayashi ¹	DMEM+ 10%BCA	2000	3 дня
OE19	желудок (эзофагиальная карцинома)	Культуры hpa	RPMI1640+10%BCA	5000	5 дней
Calu-3	плевральный выпот аденокарциномы легких	ATCC	MEM+ 10%BCA	5000	5 дней
SKOV-2	аденокарцинома яичников, асцит	ATCC	модифицированная McCoyba+10%BCA	2000	3 дня
MDA-MB-453	выпот в полость перикарда метастазирующего рака молочной железы	ATCC	DMEM+ 10%BCA	2000	5 дней

¹ Kurebayashi et al (1999) Br. J. Cancer. 79; 707-717

HCC202	первичная протоковая карцинома	ATCC	RPMI1640+10%BCA	5000	5 дней
ZR-75-30	молочная железа, протоковая карцинома, злокачественный асцит	ATCC	RPMI1640+10%BCA	5000	5 дней
MDA-MB-178VII	плевральный выпот протоковой карциномы	ATCC	RPMI1640+10%BCA	5000	5 дней

(57) Формула изобретения

1. Связывающая молекула, которая специфически связывается с двумя различными эпитопами на HER2, при этом связывающая молекула включает

(а) первый связывающий (поли)пептид, который специфически связывается с первым эпитопом на HER2, при этом указанный первый связывающий (поли)пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична ей; и

(b) второй связывающий (поли)пептид, который специфически связывается со вторым эпитопом на HER2, где второй связывающий (поли)пептид является антителом, имеющим тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична ей, и легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155, или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.

2. Связывающая молекула по п. 1, при этом первый и второй связывающие (поли)пептиды соединены линкером.

3. Связывающая молекула по п. 2, при этом линкер представляет собой пептидный линкер.

4. Связывающая молекула по п. 3, где линкер представляет собой (Gly₄Ser)₃.

5. Связывающая молекула по любому из пп. 1-4, где (i) первый связывающий (поли)пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и

(ii) антитело, представляющее собой второй связывающий (поли)пептид, имеет

тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155.

6. Связывающая молекула по п. 5, где С-конец SEQ ID NO: 1 связан с N-концом SEQ ID NO: 155.

5 7. Связывающая молекула по п. 5, где С-конец SEQ ID NO: 1 связан с N-концом SEQ ID NO: 155 через $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ линкер.

8. Связывающая молекула по любому из пп. 1-7,

10 где (i) первый связывающий (поли)пептид имеет константу диссоциации для связывания HER2 по меньшей мере 1×10^{-8} М, при определении методом поверхностного плазмонного резонанса, и связывается с эпитопом в пределах SEQ ID NO: 172, где данный эпитоп предпочтительно содержит положения T166, R188, P197, S202 и R203 SEQ ID NO: 172; и

15 (ii) второй связывающий (поли)пептид имеет константу диссоциации для связывания HER2 по меньшей мере 1×10^{-9} М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по любому из пп. 1-7.

10. Экспрессирующий вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9.

20 11. Клетка-хозяин для экспрессии связывающей молекулы по п. 1, трансформированная вектором по п. 10.

12. Способ получения связывающей молекулы, которая специфически связывается с двумя различными эпитопами на HER2, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 11 в подходящих условиях и выделение продуцированной связывающей молекулы.

25 13. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая:

(i) терапевтически эффективное количество связывающей молекулы по любому из пп. 1-7;

(ii) терапевтически эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты по п. 9; или

30 (iii) терапевтически эффективное количество вектора по п. 10.

14. Связывающая молекула по любому из пп. 1-7 для применения при лечении опухолей, при этом опухоль выбирают из группы, включающей рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак слюнных желез, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почек, рак легких, затрагивающий верхний отдел желудочно-кишечного тракта рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, карциному головы и шеи, рак шейки матки, глиобластому, злокачественный асцит, лимфомы и лейкозы.

40 15. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 9 для применения при лечении опухолей, при этом опухоль выбирают из группы, включающей рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак слюнных желез, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почек, рак легких, затрагивающий верхний отдел желудочно-кишечного тракта рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, карциному головы и шеи, рак шейки матки, глиобластому, злокачественный асцит, лимфомы и лейкозы.

45 16. Вектор по п. 10 для применения при лечении опухолей, при этом опухоль выбирают из группы, включающей рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак слюнных желез, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почек, рак легких, затрагивающий верхний отдел желудочно-

кишечного тракта рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, карциному головы и шеи, рак шейки матки, глиобластому, злокачественный асцит, лимфомы и лейкозы.

17. Клетка-хозяин по п. 11 для применения при лечении опухолей, при этом опухоль
5 выбирают из группы, включающей рак молочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак слюнных желез, рак эндометрия, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почек, рак легких, затрагивающий верхний отдел желудочно-кишечного тракта рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак предстательной
10 железы, плоскоклеточный рак, карциному головы и шеи, рак шейки матки, глиобластому, злокачественный асцит, лимфомы и лейкозы.

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Covagen AG
 <120> Novel binding molecules with antitumoral activity
 <130> U1261 PCT
 <150> EP 12 15 9938.5
 <151> 2012-03-16
 <160> 172
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Fynomer #1 C12
 <400> 1
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60
 <210> 2
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Fynomer #1 G10
 <400> 2
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30
 Leu Lys Arg Trp Arg Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp
 50 55 60
 Ser Ile Gln

Страница 1

65

<210> 3
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #3

<400> 3

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30

Leu Thr Arg Trp Ala Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Ile Gln
 65

<210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #4

<400> 4

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 5
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #5

<400> 5

Страница 2

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Phe
1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Thr Met Trp Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35 40 45

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

Ile Gln
65

<210> 6
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #6

<400> 6

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu His Ala Ser Met Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Ile Gln
65

<210> 7
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #7

<400> 7

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asp
20 25 30

Страница 3

Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 8
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #8

<400> 8

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Ser
1 5 10 15

Ser His Pro His Val Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Asn Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Ile Gln
65

<210> 9
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #9

<400> 9

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Asn His Pro Pro Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Ile Gln
65

Страница 4

<210> 10
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #10

<400> 10

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Tyr Asp Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Pro Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30

Asn Ser Ser Glu Gly Thr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 11
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #11

<400> 11

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Met Pro
 1 5 10 15

Lys Val Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
 20 25 30

Gln Glu Pro Gln Ser Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Ile Gln
 65

<210> 12
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #12

Страница 5

<400> 12

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

<210> 13

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #13

<400> 13

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

<210> 14

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #14

<400> 14

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Asn Asn Ser
1 5 10 15
Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asn
20 25 30
Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
Страница 6

35 40 45

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

<210> 15
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #15

<400> 15

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Arg
20 25 30

Ala Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 16
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #16

<400> 16

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Asn
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Glu
20 25 30

Leu Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 17
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #17

<400> 17

Страница 7

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Arg Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Lys
20 25 30

Ser Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 18
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #18

<400> 18

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Ala
20 25 30

His Ser Leu Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 19
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #19

<400> 19

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Glu
20 25 30

Gln Asp Leu Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

Страница 8

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

Gln
65

<210> 20
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #20

<400> 20

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Lys
1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Thr
20 25 30

Asp Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 21
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #21

<400> 21

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Pro
20 25 30

Lys Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 22
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #22

Страница 9

<400> 22

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Gln
 20 25 30

His Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 23

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #23

<400> 23

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
 20 25 30

Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 24

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #24

<400> 24

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ala
 20 25 30

Thr Asp Ala Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 Страница 10

12

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Arg Asp
1 5 10 15

His Ser Pro His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Asn Leu Tyr Gln Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Ile Gln
65

<210> 28
<211> 66
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #28

<400> 28

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Ser Pro Gln Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35 40 45

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

Ile Gln
65

<210> 29
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #29

<400> 29

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Val His Pro
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
20 25 30

Страница 12

Tyr Gln Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 30
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #30

<400> 30

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Gln
20 25 30

His Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 31
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #31

<400> 31

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Met
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Arg
20 25 30

Gly Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 32
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #32

Страница 13

<400> 32

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Arg
20 25 30

Pro Arg Asp Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 33

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #33

<400> 33

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu His Thr
20 25 30

Thr Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 34

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #34

<400> 34

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu His Trp
20 25 30

Asn Gly Gly Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
Страница 14

35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60

Gln
 65

<210> 35
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #35

<400> 35

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Asn
 20 25 30

Thr Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 36
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #36

<400> 36

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Trp Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
 20 25 30

Glu Glu Thr Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 37

Страница 15

<211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #37

<400> 37

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
 20 25 30

Arg Gln Arg Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 38
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #38

<400> 38

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30

Pro Met Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 39
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #39

<400> 39

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Thr
20 25 30

Thr Asp Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 40
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #40

<400> 40

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Met Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Glu
20 25 30

Thr Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 41
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #41

<400> 41

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Gln
20 25 30

Asn Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

Страница 17

<210> 42
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #42

<400> 42

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 43
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #43

<400> 43

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 44
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #44

<400> 44

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
 Страница 18

20 25 30

Ala Thr Leu Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 45
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #45

<400> 45

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Lys
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Glu
20 25 30

Thr Ser Pro Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 46
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #46

<400> 46

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser His
20 25 30

Thr Thr Ser Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Страница 19

50 55 60

Gln
65

<210> 47
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #47
<400> 47

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Met
20 25 30

Ala Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 48
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #48
<400> 48

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
20 25 30

Gly Pro Asp Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 49
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

Страница 20

<220>

<223> Fynomer #49

<400> 49

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
 20 25 30

Pro Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 50

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #50

<400> 50

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asn Ser Tyr Asn Lys
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30

Ala Ala Glu Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 51

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #51

<400> 51

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Lys Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30

Ser Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 52
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #52

<400> 52

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Tyr
20 25 30

Pro Arg Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 53
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #53

<400> 53

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Lys
20 25 30

Thr Pro Arg Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 54
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #54

<400> 54

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asp Ser
 20 25 30

Gln Glu Pro Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 55
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #55

<400> 55

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Gln
 20 25 30

Tyr Pro Lys Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 56
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #56

<400> 56

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Gln
20 25 30

Gln Ala Gly Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 57

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #57

<400> 57

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ala
20 25 30

His Gln Ser Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 58

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #58

<400> 58

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Pro
Страница 24

20 25 30

Gln Ser Arg Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 59
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #59

<400> 59

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Gly
20 25 30

Gln Ser Met Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 60
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #60

<400> 60

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Arg
20 25 30

Gln Asp Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Страница 25

50 55 60

Gln
65

<210> 61
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #61

<400> 61

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

<210> 62
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #62

<400> 62

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

Gln
65

<210> 63
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #63

<400> 63

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln His
20 25 30

Lys Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 64

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #64

<400> 64

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Asn
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Lys
20 25 30

Arg Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 65

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #65

<400> 65

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Lys
20 25 30

Ser Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

Страница 27

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

<210> 66
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #66

<400> 66

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Pro
 20 25 30

Asn Ser Ala Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 67
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #67

<400> 67

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Pro
 20 25 30

Gln Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 68
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #68

Страница 28

<400> 68

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Tyr Asn Lys
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gln
 20 25 30

His Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 69

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #69

<400> 69

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gln
 20 25 30

Asn Leu Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 70

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #70

<400> 70

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Leu
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Ser
 20 25 30

His Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 Страница 29

31

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Thr
20 25 30

Thr Ala Met Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 74
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #74

<400> 74

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Val
20 25 30

Asn Pro Met Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 75
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #75

<400> 75

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Gln
20 25 30

Gln Arg Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 76
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #76

<400> 76

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Val
 20 25 30

Pro Gln Asp Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 77
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #77

<400> 77

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 1 5 10 15

Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30

Gln Asp Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 78
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #78

<400> 78

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
 Страница 32

Страница 33

35 40 45

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

<210> 81
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #081

<400> 81

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asn
 1 5 10 15

Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30

Asp Pro Leu His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 82
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #82

<400> 82

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30

Lys Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 83
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #83
 <400> 83
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ser Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
 20 25 30
 Pro Pro Leu Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 84
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #84
 <400> 84
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Thr Gly Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 85
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #85
 <400> 85
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Lys
20 25 30

Pro Lys Tyr Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 86
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #86

<400> 86

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Glu
20 25 30

Pro Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 87
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #87

<400> 87

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Val His
20 25 30

Asp Pro Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 88
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #88

<400> 88

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Val Ser Trp Asn Thr
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30

Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr Gly
 35 40 45

Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 89
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #89

<400> 89

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Tyr
 1 5 10 15

Ser Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
 20 25 30

Arg Arg Trp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 90
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #90

<400> 90

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Pro
 Страница 37

20 25 30

Pro Asn Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 91
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #91

<400> 91

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Arg
20 25 30

Met Pro Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 92
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #92

<400> 92

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Phe Arg
1 5 10 15

Arg Asn Tyr Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Gln Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35 40 45

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

Ile Gln
65

<210> 93

Страница 38

<211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #93

<400> 93

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asp Arg Arg Tyr Gly
 1 5 10 15

Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Asp
 20 25 30

Glu Ala Val Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 94
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #94

<400> 94

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu His Asp
 20 25 30

Pro Pro Ser Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 95
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #95

<400> 95

Страница 39

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Tyr Ala
1 5 10 15

Pro Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30

His Asp Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 96
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #96

<400> 96

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Ser Tyr Pro
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asn
20 25 30

Asp Pro Val His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 97
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #97

<400> 97

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Trp Thr Pro
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Gln
20 25 30

Asp Glu Gln Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

Страница 40

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

Gln
 65

<210> 98
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #98

<400> 98

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Phe Thr Asn Thr Pro
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Thr
 20 25 30

Ser Tyr Leu Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 99
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #99

<400> 99

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Thr His Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Gly
 20 25 30

Arg Val Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 100
 <211> 65
 <212> PRT

Страница 41

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #100

<400> 100

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Thr Tyr Thr Pro
1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Lys
20 25 30

Pro Pro Gln Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 101

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #101

<400> 101

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Tyr Gln
1 5 10 15

Asp Leu Glu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
20 25 30

Asn Gly Arg Arg Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 102

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #102

<400> 102

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asp Arg His Tyr Thr
Страница 42

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

 <210> 103
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Fynomer #103

 <400> 103
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
 20 25 30

 Ser Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

 <210> 104
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Fynomer #104

 <400> 104
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Arg
 1 5 10 15

 Pro Thr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly
 20 25 30

 Asp Glu Gln Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

 Gln

Страница 43

65

<210> 105
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #105

<400> 105

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Thr Tyr Arg Lys
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30

Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 106
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #106

<400> 106

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30

Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 107
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #107

<400> 107

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Страница 44

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asp
20 25 30

Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 108
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #108

<400> 108

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
20 25 30

Ser Asp Gly Thr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 109
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #109

<400> 109

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Trp Ser
20 25 30

Asp Ala Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 110
<211> 63
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #110

<400> 110

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Met Ala
20 25 30

Trp Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 111

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #111

<400> 111

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Glu Gly
1 5 10 15

Gly Asn Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30

Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 112

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #112

<400> 112

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala His Asp Gln
1 5 10 15

His Arg Pro Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
Страница 46

20 25 30

Asn Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35 40 45

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

Ile Gln
65

<210> 113
<211> 66
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #113

<400> 113

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Leu Ser
1 5 10 15

Ser His Pro His Val Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Asn Ser Ser Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
35 40 45

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

Ile Gln
65

<210> 114
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #114

<400> 114

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Leu Met
20 25 30

His Pro Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

Страница 47

50 55 60

<210> 115
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #115

<400> 115

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg His Ala
 1 5 10 15

Pro Val Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly
 20 25 30

Asp Asn Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 116
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #116

<400> 116

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Thr Lys
 1 5 10 15

His Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser
 20 25 30

Gln Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

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

<210> 117
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #117

<400> 117

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg His Glu
 1 5 10 15

Страница 48

Asn Phe Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30

Arg Gly Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 118
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #118

<400> 118

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Asp
1 5 10 15

Ser His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
20 25 30

Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 119
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #119

<400> 119

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Arg Thr
1 5 10 15

His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
20 25 30

Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 120
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #120

<400> 120

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Pro Met
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
 20 25 30

Arg Val Ser Ile Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45

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

Gln
 65

<210> 121
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #121

<400> 121

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Phe
 20 25 30

Asn Pro Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

Gly Tyr Ile Pro Ser Ser Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 122
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #122

<400> 122

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 Страница 50

1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Phe Pro
 20 25 30

Asp Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 123
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #123

<400> 123

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30

Pro His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 124
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #124

<400> 124

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Lys
 20 25 30

Gly Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 125

Страница 51

<211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #125

<400> 125

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Asp
 20 25 30

Gln His Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 126
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #126

<400> 126

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

<210> 127
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #127

<400> 127

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Glu Tyr
 20 25 30

Страница 52

Thr Thr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 128
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #128

<400> 128

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Thr
20 25 30

Glu Ala Thr Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 129
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #129

<400> 129

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Asn
20 25 30

Ser Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 130
<211> 63
<212> PRT

Страница 53

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #130

<400> 130

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Asn
20 25 30

Thr Gln Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 131

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #131

<400> 131

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ala
20 25 30

Arg Tyr Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 132

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #132

<400> 132

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly His
20 25 30

His Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr

Страница 54

35 40 45

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

<210> 133
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #133

<400> 133

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Met
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Asn
20 25 30

Ser Asp Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 134
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #134

<400> 134

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Asp
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Lys
20 25 30

Asp Ser Ala Leu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 135
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #135
 <400> 135
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ser
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Arg
 20 25 30
 Gly Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 136
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #136
 <400> 136
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 His Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Met
 20 25 30
 Gln Ser Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 137
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #137
 <400> 137
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Arg
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Glu Thr
 20 25 30
 Gln Asn Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

Страница 56

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

<210> 138
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #138

<400> 138

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gly Ser
20 25 30

Thr Ala Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 139
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #139

<400> 139

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
20 25 30

Leu Arg Ser Trp Pro Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Ile Gln
65

<210> 140
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #140

Страница 57

<400> 140

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30

Leu Lys Thr Trp Glu Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Ile Gln
 65

<210> 141

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #141

<400> 141

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
 20 25 30

Leu Gln Ala Trp Gln Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Ile Gln
 65

<210> 142

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #142

<400> 142

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 Страница 58

20 25 30

Glu Asp Gly Val Trp Trp Ala Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ile
35 40 45

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

<210> 143
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #143

<400> 143

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
20 25 30

Glu Asp Gly Val Trp Trp Arg Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 144
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #144

<400> 144

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
20 25 30

Glu Asp Gly Val Trp Trp Thr Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Val
35 40 45

Gly Phe Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

<210> 145
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #145
 <400> 145
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Ile Trp Trp Gln Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Phe Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 146
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #146
 <400> 146
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Pro Pro
 20 25 30
 Tyr Pro Thr Gly Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
 35 40 45
 Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
 50 55 60
 Gln
 65

<210> 147
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Fynomer #147
 <400> 147
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Gln Val
 20 25 30

Страница 60

Leu Asp Asn Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

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

<210> 148
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #148

<400> 148

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Gln Ala Tyr Gly Met
1 5 10 15

Tyr Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Thr Ala
20 25 30

Leu Pro Asp Arg Gly Tyr Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 149
<211> 63
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Fynomer #149

<400> 149

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Asp
20 25 30

Asp Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 150
<211> 65
<212> PRT

Страница 61

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #150

<400> 150

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Phe
20 25 30

Gln Ser Ala Gly Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

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

Gln
65

<210> 151

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #151

<400> 151

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ala Arg
20 25 30

Asp Asn Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45

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

<210> 152

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Fynomer #152

<400> 152

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Asp Ser
1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile
Страница 62

20 25 30
 Leu Trp Asn Thr Gly Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr
 35 40 45
 Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser
 50 55 60
 Ile Gln
 65
 <210> 153
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Fc fusion of Fynomer C12 (Fynomer #1; SEQ ID NO:1)
 <400> 153
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Страница 63

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240
Gly Ser Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr
245 250 255
Asn Thr Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu
260 265 270
Arg Met Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
275 280 285
Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
290 295 300
Gln
305

<210> 154
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> anti HER2 antibody 1, heavy chain

<400> 154

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

Страница 64

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

355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 155
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> anti HER2 antibody 1, light chain

<400> 155

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 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 Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 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> 156
<211> 527
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> C-terminal heavy chain fusion protein of Fynomer C12 (Fynomer #1;
SEQ ID NO:1) with anti HER2 antibody 1, heavy chain (SEQ ID
NO:154)

<400> 156

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 Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 465 470 475 480
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 485 490 495
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 500 505 510
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 515 520 525
 <210> 157
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> C-terminal light chain fusion protein of Fynomer C12 (Fynomer #1;
 SEQ ID NO:1) with anti HER2 antibody 1, light chain (SEQ ID
 NO:155)
 <400> 157
 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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 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 Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 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 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ser Tyr Asn Thr Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe
 245 250 255
 Gln Ile Leu Arg Met Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu
 260 265 270
 Thr Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val
 275 280 285
 Asp Ser Ile Gln
 290
 <210> 158
 <211> 527
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> N-terminal heavy chain fusion of Fynomer C12 (Fynomer #1; SEQ ID
 NO:1) with anti HER2 antibody 1, heavy chain (SEQ ID NO:154)
 <400> 158
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
290 295 300

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
305 310 315 320

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
325 330 335

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
340 345 350

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
355 360 365

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
370 375 380

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
385 390 395 400

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
405 410 415

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
420 425 430

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
435 440 445

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
450 455 460

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
465 470 475 480

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
485 490 495

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
500 505 510

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
515 520 525

<210> 159

<211> 292

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> N-terminal light chain fusion protein of Fynomer C12 (Fynomer #1;
SEQ ID NO:1) with anti HER2 antibody 1, light chain (SEQ ID

Страница 72

NO:155)

<400> 159

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln Gly
 50 55 60
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 65 70 75 80
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 85 90 95
 Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 100 105 110
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 115 120 125
 Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 130 135 140
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 145 150 155 160
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe
 165 170 175
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 180 185 190
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 195 200 205
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 210 215 220
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 245 250 255

Страница 73

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
260 265 270

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
275 280 285

Arg Gly Glu Cys
290

<210> 160
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> anti HER2 antibody 2, heavy chain

<400> 160

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

Страница 74

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
 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
 305 310 315 320
 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
 450

Страница 75

<210> 161
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> N-terminal light chain fusion protein of Fynomer C12 (Fynomer #1;
 SEQ ID NO:1) with anti HER2 antibody 2, light chain (SEQ ID
 NO:163)

 <400> 161
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Thr Ser Tyr Asn Thr
 1 5 10 15
 Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg Met
 20 25 30
 Glu Asp Gly Val Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln Gly
 50 55 60
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 65 70 75 80
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 85 90 95
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 100 105 110
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 115 120 125
 Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg
 130 135 140
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 145 150 155 160
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 165 170 175
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 180 185 190
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 195 200 205
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 210 215 220

Страница 76

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
225 230 235 240

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
245 250 255

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
260 265 270

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
275 280 285

Arg Gly Glu Cys
290

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> myc-hexahistidine tag (SEQ ID NO: 162)

<400> 162

Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His
1 5 10 15

His

<210> 163
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> anti HER2 antibody 2, light chain

<400> 163

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

Страница 77

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> 164
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> wildt-type SH3 domain of the Fyn kinase (Fyn SH3)
 <400> 164

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

<210> 165
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

Страница 78

<220>
 <223> Anti-HER2 antibody 1 (heavy chain) (coding for amino acids shown in SEQ ID NO: 154)

<400> 165
 gaggtgcagc tggtcgaatc tggtaggggc ctggtgcagc ctgggggctc cctgagactg 60
 tcctgtgccg catccgggtt tacatttacc gactacacaa tggattgggt gcgacaggca 120
 cccgggaagg gtctggagtg ggtggctgac gtgaacccta attccggcgg aagcatctac 180
 aaccagaggt tcaagggccg gtttactctg tctgtggaca ggagtaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga attccctgag agccgaagat acagctgtct actattgcgc tcgcaatctg 300
 ggtccatcat tctactttga ctattggggg cagggaaactc tggtagactgt ctcatccgt 360
 agcacaagg gccctagtgt gtttctctg gctccctctt ccaaaccac ttctggtggc 420
 actgtctgctc tgggatgcct ggtgaaggat tactttcctg aacctgtgac tgtctcatgg 480
 aactctggtg ctctgacttc tgggtgtccac actttccctg ctgtgctgca gtctagtggg 540
 ctgtactctc tgtcatctgt ggtcactgtg ccctcttcat ctctgggaac ccagacctac 600
 atttgaatg tgaaccacaa accatccaac actaaagtgg acaaaaaagt ggaacccaaa 660
 tcctgtgaca aaaccacac ctgccacct tgtcctgccc ctgaactgct gggaggacct 720
 tctgtgtttc tgttcccccc caaaccaaag gataccctga tgatctctag aaccctgag 780
 gtgacatgtg tggtagtgga tgtgtctcat gaggaccctg aggtcaaatt caactggtac 840
 gtggatggag tgggaagtcca caatgccaaa accaagccta gagaggaaca gtacaattca 900
 acctacagag tggtcagtgt gctgactgtg ctgcatcagg attggctgaa tggcaaggaa 960
 tacaagtgtg aagtctcaaa caaggccctg cctgtcccaa ttgagaaaac aatctcaaag 1020
 gccaaaggac agcctaggga accccaggtc tacaccctgc caccttcaag agaggaaatg 1080
 accaaaaacc aggtgtccct gacatgcctg gtcaaaggct tctacccttc tgacattgct 1140
 gtggagtggg agtcaaatgg acagcctgag aacaactaca aaacaacccc ccctgtgctg 1200
 gattctgatg gctctttctt tctgtactcc aaactgactg tggacaagtc tagatggcag 1260
 caggggaatg tcttttcttg ctctgtcatg catgaggctc tgcataacca ctacactcag 1320
 aaatccctgt ctctgtctcc tggcaaatga tagtaaaagc tt 1362

<210> 166
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Anti-HER2 antibody 1 (light chain) (coding for amino acids shown in SEQ ID NO:155)

<400> 166
 gatattccaga tgaccagag ccctagtagt ctgagcgcaa gcgtcgggga ccgtgtgacc 60
 attacctgta aagcaagcca ggatgtgtct atcgggtgtg catggtatca gcagaagccc 120
 ggcaagccc ctaagctgct gatctactct gctagttaca gatatactgg agtcccaagt 180

Страница 79

```

cggttctcag gctccggaag cgggaccgac tttaccctga caatctctc cctgcaaccc 240
gaggatttcg ccacatacta ttgccagcag tactacatct atccttatac attcgggcag 300
gggacaaaag tggaaatcaa acggactgtg gcggcgccct 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 gctgatagta aaagctt 657

```

```

<210> 167
<211> 891
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> N-terminal fusion of C12 to light chain of anti-HER2 antibody 1
(coding for amino acids shown in SEQ ID NO: 159)

```

```

<400> 167
ggggtgactc tgctcgtcgc tctgtatgat tacacttctc ataacaccag agacctgagc 60
ttccacaagg gcgagaaatt tcagatcctg aggatggagg atggagtgtg gtgggaagcc 120
cggctctctga ccacagggga gacaggttac attccttcaa actacgtcgc tcccgtaggac 180
agcattcagg gtggtggggg atccggcgga ggaggagtg gcggaggagg aagtgatatc 240
cagatgacct agagccctag tagtctgagc gcaagcgtcg gggaccgtgt gaccattacc 300
tgtaaagcaa gccaggatgt gtctatcggg gtggcatggg atcagcagaa gcccggcaaa 360
gccccctaag tgctgatcta ctctgctagt tacagatata ctggagtccc aagtcggttc 420
tcaggctccg gaagcgggac cgactttacc ctgacaatct cctccctgca acccgaggat 480
ttcgccacat actattgcca gcagtactac atctatcctt atacattcgg gcaggggaca 540
aaagtggaaa tcaaacggac tgtggcggcg ccttctgtgt tcattttccc cccatctgat 600
gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga 660
gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct 720
gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca tactccctgt cctctactct gacctgagc 780
aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct 840
agtctgtgta ccaaatcctt caatagggga gagtgtgat agtaaaagct t 891

```

```

<210> 168
<211> 1365
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> Anti-HER2 antibody 2 (heavy chain) (coding for amino acids shown
in SEQ ID NO: 160)

```

```

<400> 168
gaagtcagc tggtcgaatc tgggtggtggc ctggtccagc ctggtggatc actgagactg      60
tcctgtgctg cttctggttt caacatcaag gacacctaca tccattgggt cagacaggca      120
cctggcaagg gactggaatg ggtcgcccga atctacccta caaacggcta cactcgctac      180
gccgactccg tcaagggacg ctttaccatc tccgccgaca cctctaaaaa caccgcctac      240
ctgcagatga atagtctgag ggccgaggat actgctgtgt actactgctc acgatgggga      300
ggcgacggct tttagctat ggattactgg ggacagggaa ctctggtcac tgtgtctagc      360
gctagcacia agggccctag tgtgtttcct ctggctccct cttccaaatc cacttctggt      420
ggcactgctg ctctgggatg cctggtgaag gattactttc ctgaacctgt gactgtctca      480
tggaactctg gtgctctgac ttctggtgtc cacactttcc ctgctgtgct gcagtctagt      540
ggactgtact ctctgtcatc tgtgtgctact gtgccctctt catctctggg aaccagacc      600
tacatttgta atgtgaacca caaacatcc aactactaaag tggacaaaaa agtgaaccc      660
aaatcctgtg aaaaaacca cacctgccca cctgttcctg cccctgaact gctgggagga      720
ccttctgtgt ttctgttccc ccccaaacca aaggataccc tgatgatctc tagaaccctt      780
gaggtgacat gtgtggtggt ggatgtgtct catgaggacc ctgaggtaa attcaactgg      840
tacgtggatg gagtggaagt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat      900
tcaacctaca gagtgtcag tgtgtgact gtgctgcatc aggattggct gaatggcaag      960
gaatacaagt gtaaagtctc aaacaaggcc ctgctgctc caattgagaa aacaatctca     1020
aaggccaagg gacagcctag ggaaccccag gtctacacc tgccaccttc aagagaggaa     1080
atgacaaaa accaggtgtc cctgacatgc ctggtcaaag gcttctaccc ttctgacatt     1140
gctgtggagt gggagtcaaa tggacagcct gagaacaact acaaaacaac cccccctgtg     1200
ctggattctg atggctcttt ctttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg     1260
cagcagggga atgtcttttc ttgctctgtc atgcatgagg ctctgcataa ccactacact     1320
cagaaatccc tgtctctgtc tcctggcaaa tgatagtaaa agctt                      1365

```

```

<210> 169
<211> 657
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> Anti-HER2 antibody 2 (light chain) (coding for amino acids shown
      in SEQ ID NO: 163)

```

```

<400> 169
gacatccaga tgacacagtc tcctcttcc ctgtccgctt ctgtgggcga tcgagtgaca      60
atcacctgta gggctagtca ggatgtgaat actgctgttg cttggtacca gcagaaacca      120
ggaaaagccc ctaaactgct gatctactct gcctcattcc tgtactctgg ggtgccttct      180
cgattcagtg gttctagatc tggcaccgat ttcacactga ccatttcttc actgcaacct      240
gaggattttg ccactacta ctgtcagcag cactacacaa cactccccc atttggccag      300

```

Страница 81

```

ggcacaaaag tggagatcaa acggaccgtg gcggcgccctt ctgtgttcat tttcccccca 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 gctgatagta aaagctt 657

```

```

<210> 170
<211> 891
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> N-terminal C12 fusion to anti-HER2 antibody 2 light chain (coding
for amino acids shown in SEQ ID NO: 161)

```

```

<400> 170
ggggtgactc tgttcgtcgc tctgtatgat tacacttcct ataacaccag agacctgagc 60
ttccacaagg gcgagaaatt tcagatcctg aggatggagg atggagtgtg gtgggaagcc 120
cggtctctga ccacagggga gacaggttac attccttcaa actacgtcgc tcccgtggac 180
agcattcagg gtggtggggg atccggcgga ggaggaagtg gcggaggagg aagtgacatc 240
cagatgacac agtctccctc ttccctgtcc gcttctgtgg gcgatcgagt gacaatcacc 300
tgtagggcta gtcaggatgt gaatactgct gttgcttgg accagcagaa accaggaaaa 360
gccctaaac tgctgatcta ctctgcctca ttctgtact ctggggtgcc ttctcgattc 420
agtggttcta gatctggcac cgatttcaca ctgaccattt cttactgca acctgaggat 480
tttgccacct actactgtca gcagcactac acaacacctc ccacatttgg ccagggcaca 540
aaagtggaga tcaaacggac cgtggcgggc ctttctgtgt tcattttccc cccatctgat 600
gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga 660
gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct 720
gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca tactccctgt cctctactct gacactgagc 780
aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct 840
agtcctgtga ccaaatcctt caatagggga gagtgtgat agtaaaagct t 891

```

```

<210> 171
<211> 1255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 171

```

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1          5          10          15

```

```

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20          25          30

```

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

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670
 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925
 Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975
 Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990
 Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005
 Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020
 Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 1025 1030 1035
 Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050
 Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065
 Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1070 1075 1080
 Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1085 1090 1095
 Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1115 1120 1125
 Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140
 Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155
 Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170
 Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185
 Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200
 Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215
 Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230
 Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245
 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255
 <210> 172
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

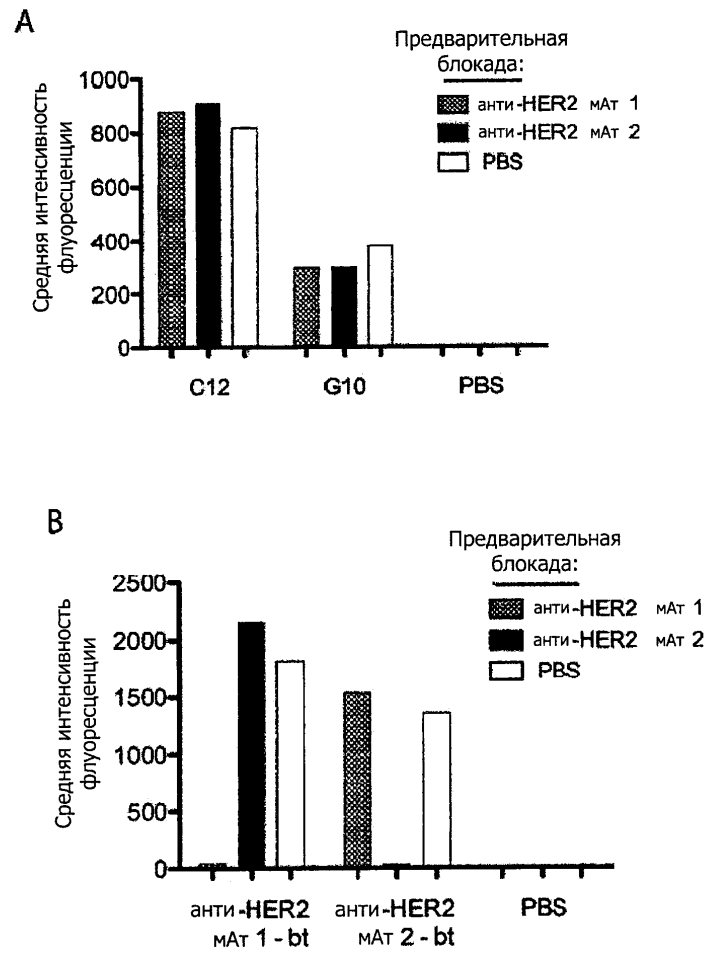
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

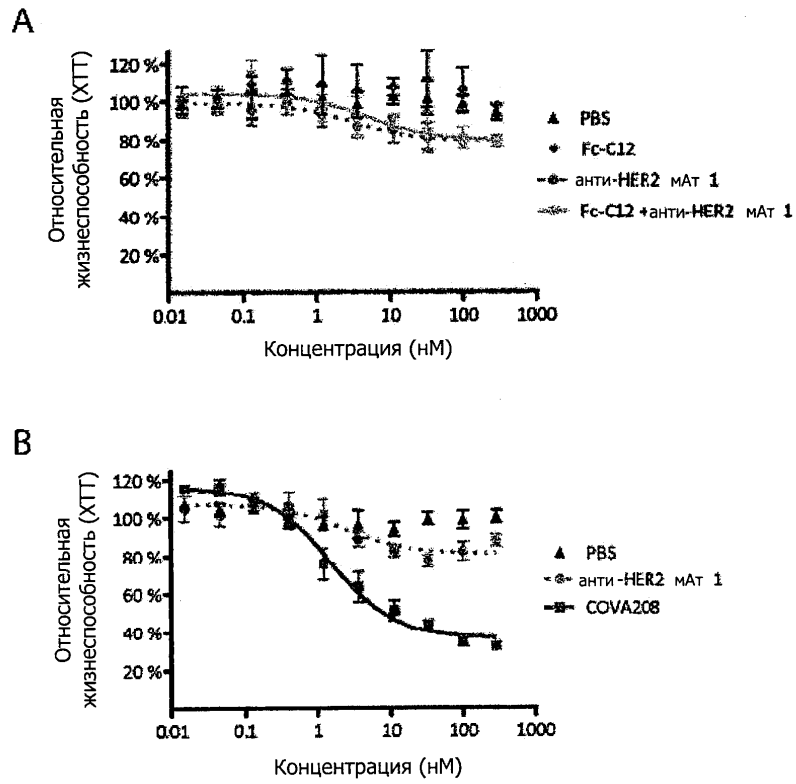
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
210 215

1/13



Фиг. 1

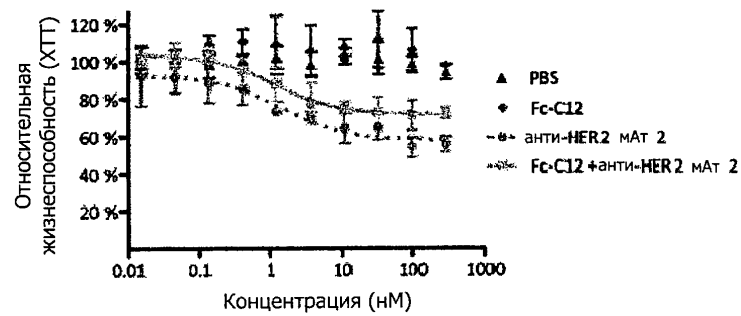
2/13



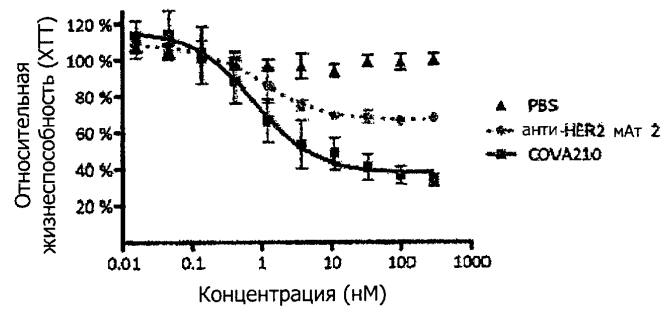
Фиг. 2

3/13

C

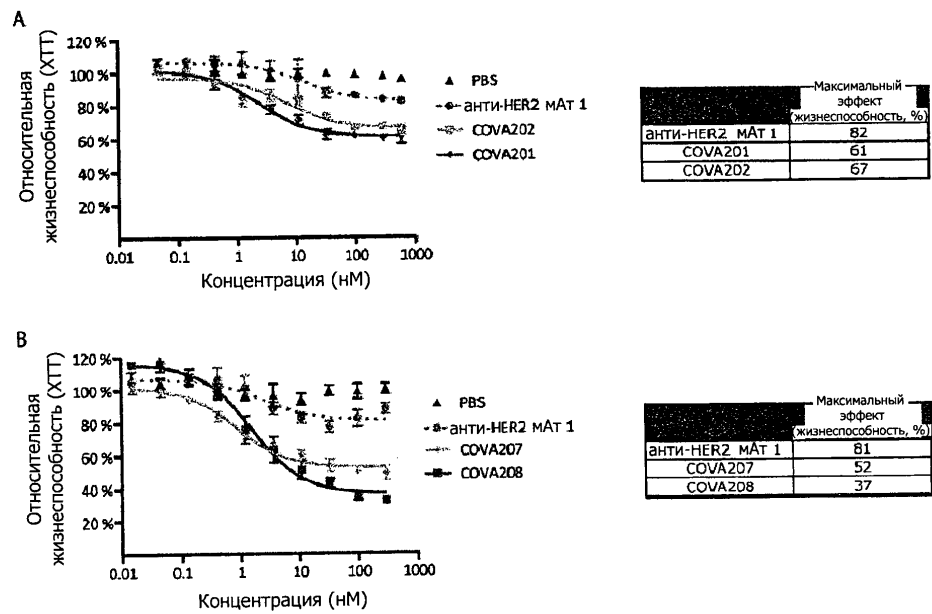


D



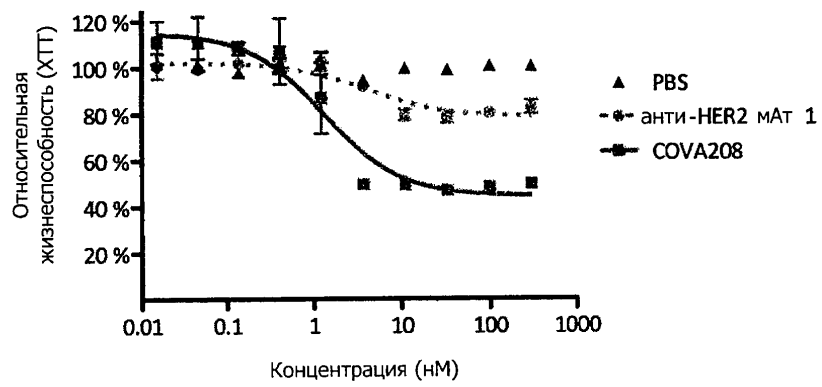
Фиг. 2
продолжение

4/13



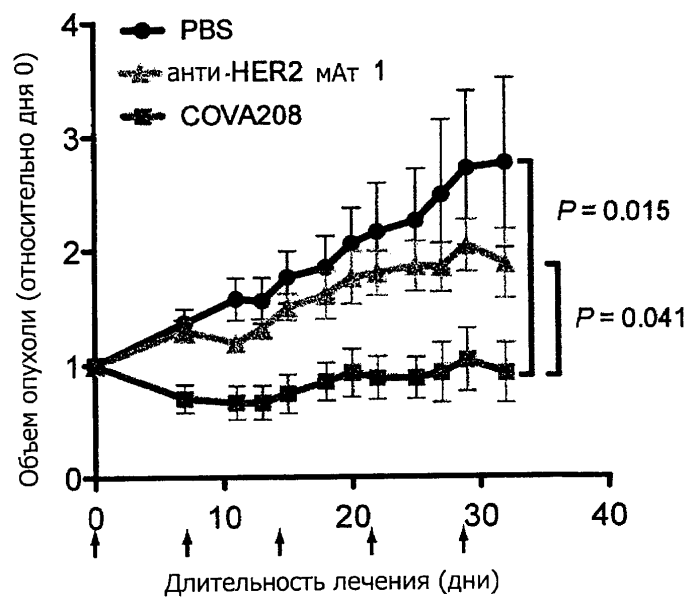
Фиг. 3

5/13



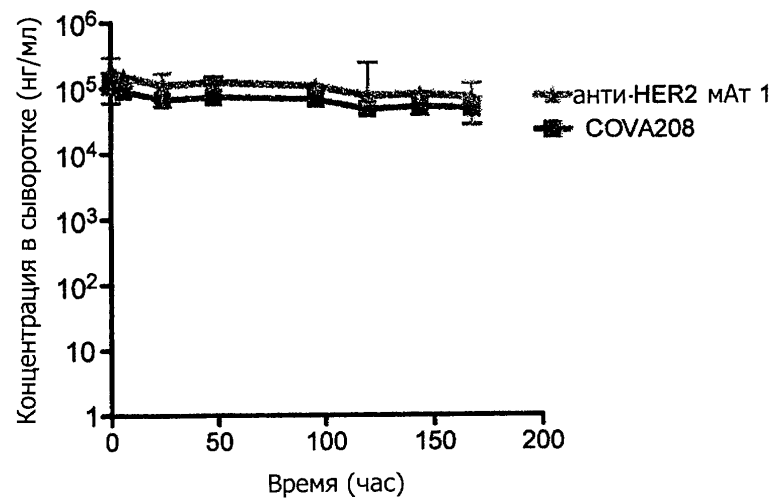
Фиг. 4

6/13



Фиг. 5

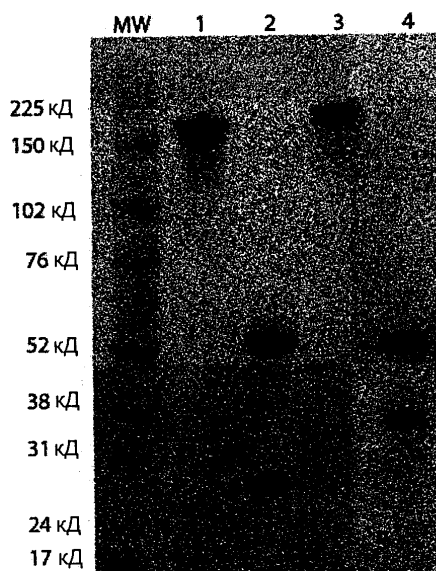
7/13



Фиг. 6

8/13

SDS-PAGE



MW: маркер молекулярной массы

полоса 1: анти-HER2 мАт 1

полоса 2: анти-HER2 мАт 1 (уменьшенная)

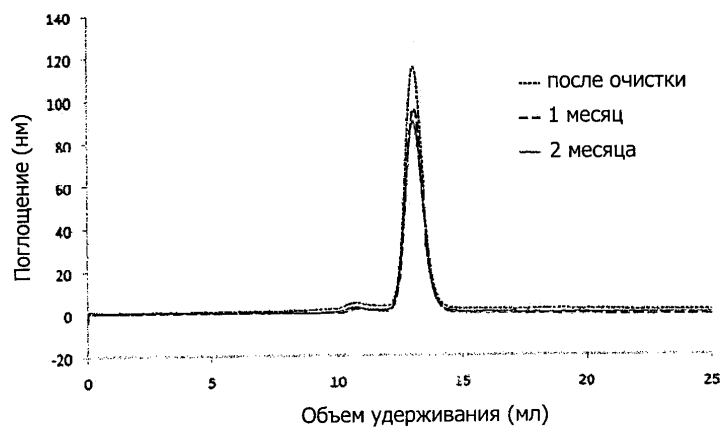
полоса 3: COVA208

полоса 4: COVA208 (уменьшенная)

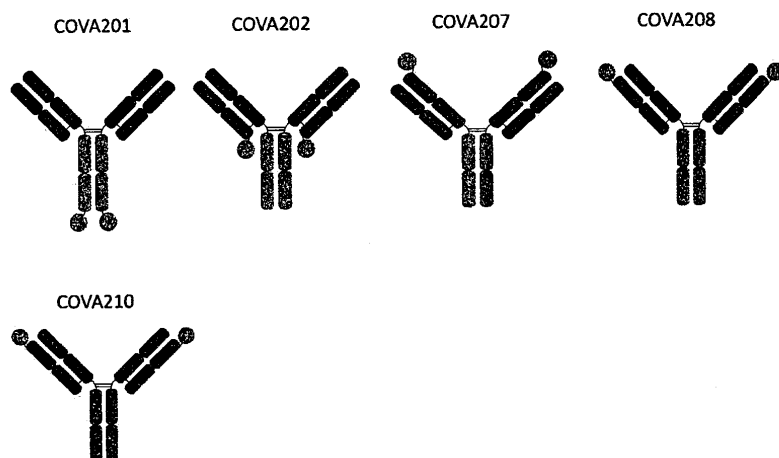
Фиг. 7

9/13

Эксклюзионная хроматография COVA208



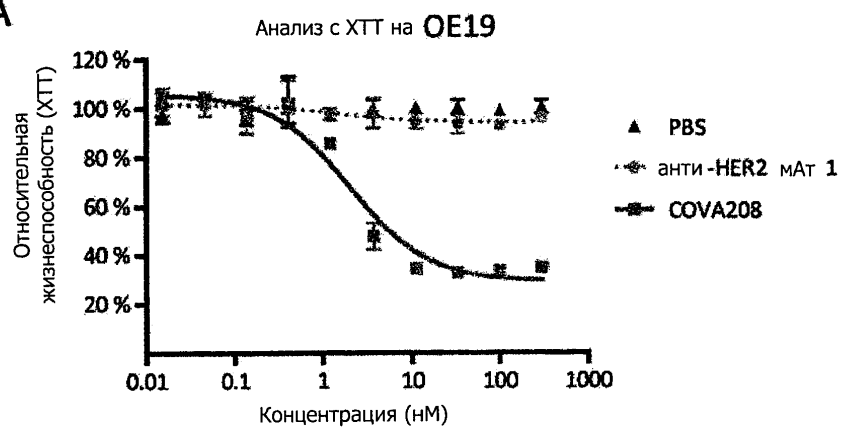
Фиг. 7
продолжение



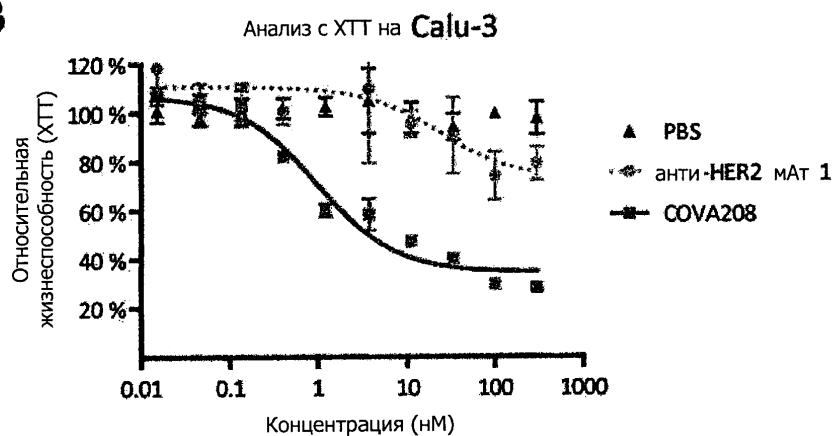
Фиг. 8

10/13

A



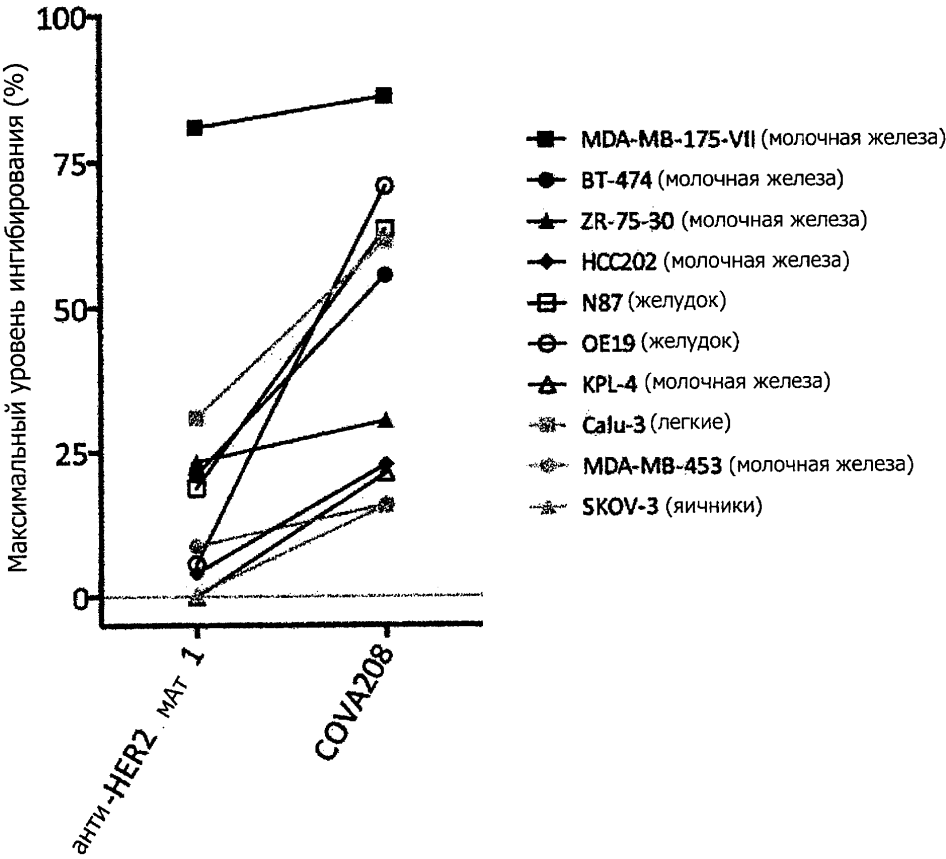
B



Фиг. 9

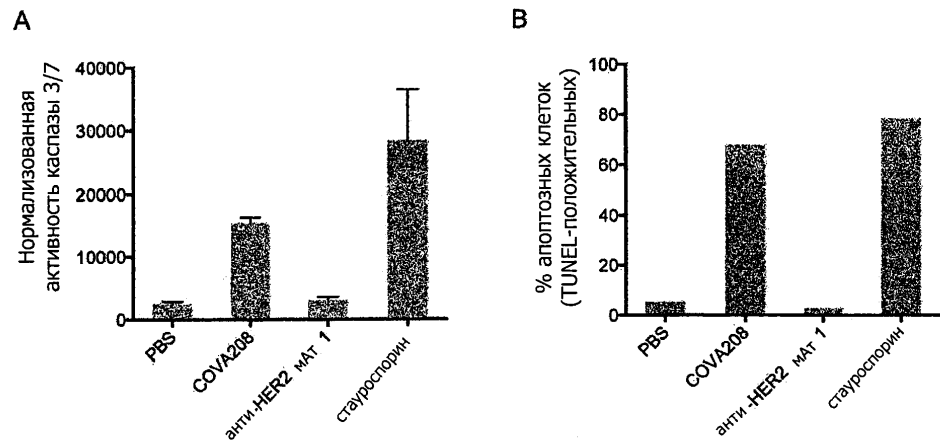
11/13

C

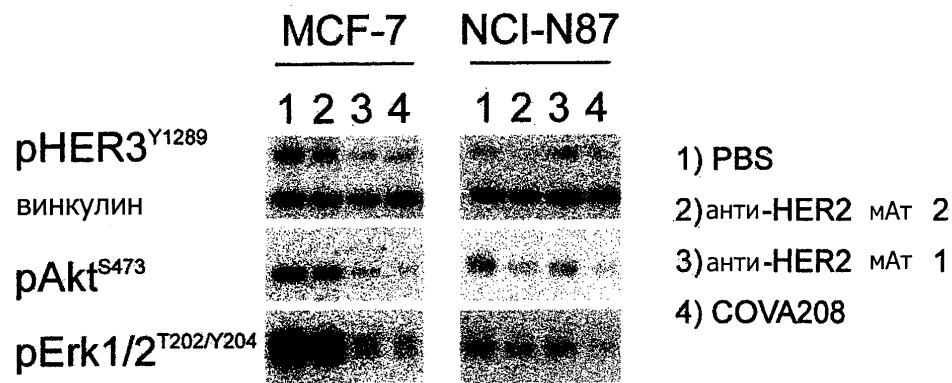


Фиг. 9
продолжение

12/13



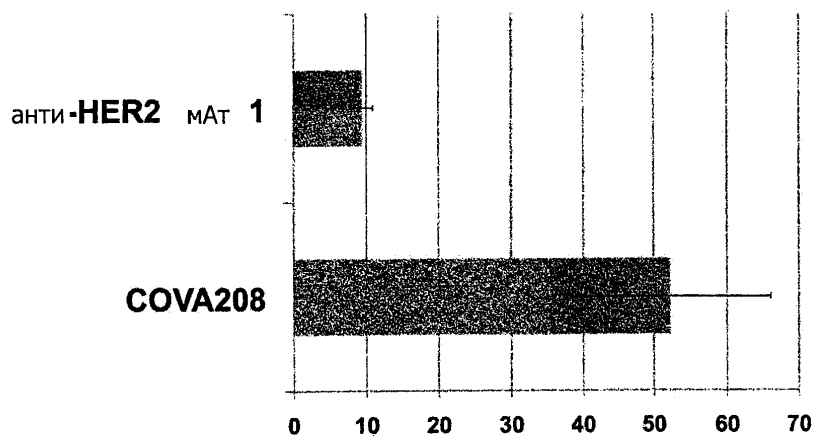
Фиг. 10



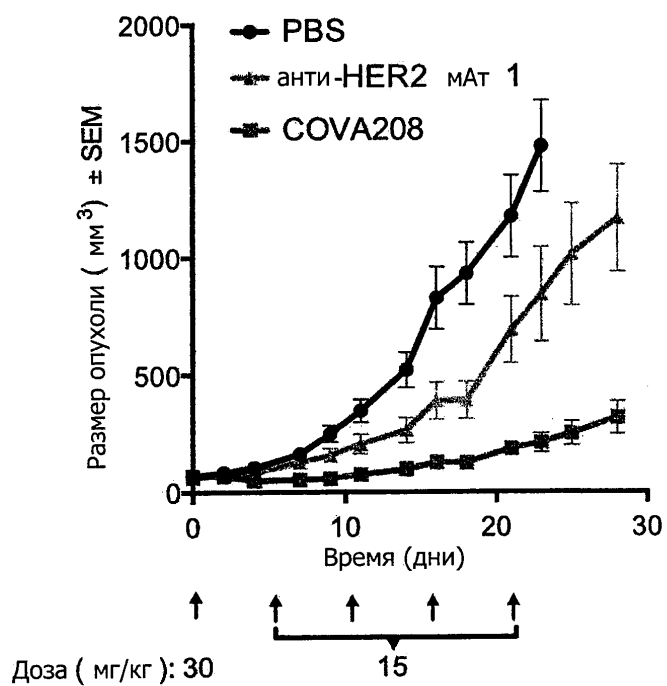
Фиг. 11

13/13

Объем в образованиях/ общий объем, %



Фиг. 12



Фиг. 13