

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191614** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.24

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.17

**(54) НОВЫЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С FOLR1, ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **18213661.4; 19160572.4**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.12.18; 2019.03.04**

**Фидлер Эрик, Хаупц Ульрих, Глосер
Маня, Боссе-Дёнекке Ева (DE)**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/085596**

(74) Представитель:

(87) **WO 2020/127224 2020.06.25**

Виноградов С.Г. (BY)

(71) Заявитель:

НАВИГО ПРОТЕИНС ГМБХ (DE)

(57) Настоящее изобретение относится к новым связывающимся белкам, специфичным для рецептора фолиевой кислоты альфа (FOLR1). Изобретение также относится к белкам, связывающимся с FOLR1, которые дополнительно содержат диагностически или терапевтически активный компонент. Дополнительные аспекты изобретения охватывают применение этих белков, связывающихся с FOLR1 в медицине, например в диагностике и терапии рака, связанного с FOLR1.

Аминокислотные последовательности белков, связывающихся с рецептором фолиевой кислоты альфа (FOLR1) (серым цветом показаны отщипы от SEQ ID NO: 46)

202191614
A1

202191614
A1

НОВЫЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С FOLR1, ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым связывающимся белкам, специфичным для рецептора фолиевой кислоты альфа (FOLR1). Изобретение также относится к белкам, связывающимся с FOLR1, которые дополнительно содержат диагностический или терапевтически активный компонент. Дополнительные аспекты изобретения охватывают использование этих белков, связывающихся с FOLR1 в медицине, например, в диагностике и терапии рака, связанного с FOLR1.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рецептор фолиевой кислоты альфа (FOLR1) представляет собой мембранный белок, заякоренный гликозилфосфатидилинозитолом, с высоким сродством к связыванию и координации транспорта активной формы фолиевой кислоты внутрь клеток. FOLR1 экспрессируется только при низкой концентрации и ограниченном распределении в нормальных тканях человека, например, в клетках проксимальных канальцев почек.

В некоторых солидных опухолях FOLR1 значительно сверх экспрессируется, особенно при солидных типах рака эпителиального происхождения. Типы рака с самой высокой частотой экспрессии FOLR1 — это карциномы яичников, эндометрия, мозга, легких и почек. Кроме того, экспрессия FOLR1 была обнаружена с промежуточной частотностью при раке головы и шеи, груди, желудка и прямой кишки.

Рак яичников имеет самый высокий уровень смертности среди всех онкологических заболеваний у женщин. Повышенные уровни FOLR1 были зарегистрированы почти при всех эпителиальных раках яичников и связаны с высоким уровнем агрессивности опухоли, что приводит к более низким интервалам без признаков заболевания и плохой общей выживаемости пациентов. Несмотря на первоначальный ответ на химиотерапию, у большинства пациентов наблюдается рецидив заболевания из-за устойчивости опухоли к химиотерапии. Не мелкоклеточный рак легкого является причиной большинства видов рака легких, при котором прогноз для пациентов плохой с низкой пятилетней выживаемостью на всех стадиях. Высокая тканевая экспрессия FOLR1 наблюдалась при многих формах рака молочной железы, отрицательных по рецепторам эстрогена/прогестерона. Кроме того, у пациентов с необычной и агрессивной формой рака грудной клетки и мезотелиями плевры также была обнаружена сверхэкспрессия FOLR1.

Для опухолей с высокими уровнями FOLR1 описано лишь несколько целевых диагностических или терапевтических средств. Одним из примеров потенциального лечения резистентного к химиотерапии (платине) рака яичников, связанного с FOLR1, является конъюгат антитела с лекарственным средством - Мирветуксимабсоравтансин, который в настоящее время проходит клинические испытания. Еще одно моноклональное антитело для лечения рака яичников и легких, проходящее клинические испытания - Фарлетузумаб.

Диагностика и лечение рака, связанного с FOLR1, недостаточно рассматриваются существующими вариантами и, как следствие, многие пациенты не получают желаемого результата от существующих стратегий.

Излишне говорить, что существует острая потребность в новых стратегиях диагностики и лечения опухолей, связанных с FOLR1.

Одной из целей настоящего изобретения является создание молекул для специфического нацеливания на FOLR1 для обеспечения возможностей целевой диагностики и лечения, включая обнаружение FOLR1-положительных опухолей. Нацеливание на этот связанный с опухолью белок может принести пользу пациентам с неудовлетворенной потребностью в новых диагностических и терапевтических методах. Нацеливание на FOLR1 предполагает потенциально нетоксичный подход к диагностике и лечению из-за низкого и ограниченного распределения FOLR1 в нормальных тканях. Таким образом, белки, специфично связывающиеся с FOLR1, могут обеспечить возможности эффективного лечения рака и, наконец, улучшить качество жизни пациентов.

Изобретение предлагает новые молекулы, связывающиеся с FOLR1 для новых и улучшенных стратегий диагностики и лечения рака, связанного с FOLR1.

Вышеописанные цели и преимущества достигаются объектом прилагаемой формулы изобретения. Настоящее изобретение удовлетворяет потребности, представленные выше, предоставляя примеры белков, связывающихся с FOLR1. Приведенный выше обзор неисчерпывающе описывает все проблемы, решаемые настоящим изобретением.

СУТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание охватывает следующее [1]-[15], не ограничиваясь конкретно ними:

[1] Белок, связывающийся с рецептором фолиевой кислоты альфа (FOLR1), содержащий аминокислоту, полученную из убиквитина в соответствии с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 46, где заменены аминокислоты, соответствующие положениям 9, 10, 12, 42, 44, 46, 62, 63, 64, 65, 66, 68 и 70 из SEQ ID NO: 46 .

[2] Белок, связывающийся с FOLR1 согласно [1], где аминокислота, соответствующая

положению 9 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, L, S или N и

положению 10 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, Q, Y или I, и

положению 12 SEQ ID NO: 46 выбирается из Y, E, W или D, и,

положению 42 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, K, Y, Q или M, и

положению 44 SEQ ID NO: 46 выбирается из L, Y, V или F, и

положению 46 SEQ ID NO: 46 выбирается из Y, D или S, и

положению 62 SEQ ID NO: 46 выбирается из L, R, D или I, и

положению 63 SEQ ID NO: 46 выбирается из G, F, L или A, и

положению 64 SEQ ID NO: 46 выбирается из G, D или Y, и

положению 65 SEQ ID NO: 46 выбирается из A, D, Y, G или M, и

положению 66 SEQ ID NO: 46 выбирается из V, H, Y или T, и

положению 68 SEQ ID NO: 46 выбирается из K, D, P или T и

положению 70 SEQ ID NO: 46 выбирается из Q, P, T, W или H, и

возможно, дополнительно модифицированы одна или несколько аминокислот в SEQ ID NO: 46.

[3] Белок, связывающийся с FOLR1 согласно [2], содержащий аминокислоту имеющую идентичность последовательности от 70% до 85% к SEQ ID NO: 46, предпочтительно от 75% до 83% к SEQ ID NO: 46, предпочтительно от 76% до 83% к SEQ ID NO: 46, предпочтительно от 79% до 83% к SEQ ID NO: 46.

[4] Белок, связывающийся с FOLR1 согласно любому из [1]-[3], где аминокислота, соответствующая положению 11 в SEQ ID NO: 46, выбирается из K или R, а положению 45 в SEQ ID NO: 46 выбирается из W, R или G.

[5] Белок, связывающийся с FOLR1 по любому из [1]-[4], содержащий аминокислотные остатки

выбранные из EEKY, EERY, EQKY, LYKE, SYKW или NIKD, соответствующих положениям 9, 10, 11 и 12 в SEQ ID NO: 46, и

выбранные из ELLWY, KLLWY, KLLRY, YLYWD, YLYGD, QLVWD или MLFWS, соответствующих положениям 42, 43, 44, 45 и 46 в SEQ ID NO: 46, и

выбранные из LGGAVLKLQ, LGDAVLKLQ, LGGAVLKLKLP, RFGDHLDLT, RFGYHLDLT, DLGGYLPLW или IAYMTLTLH, соответствующих позициям 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70, в SEQ ID NO: 46.

[6] Белок, связывающийся с FOLR1 согласно любому из [1]-[5], дополнительно содержащий замены в 1, 2, 3, 4, 5 положениях аминокислот, выбранных из положений, соответствующих положениям 6, 8, 13, 14, 20, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 48, 49, 51, 52, 58, 59, 60, 71 и 72 из SEQ ID NO: 44, предпочтительно любым выбранным из K6V, K6Q, L8R, L8E, L8Y, I13T, T14A, T14P, S20C, S20G, I23T, I23V, E24G, E24A, N25D, K29R, K29E, K29T, I30V, I30L, Q31R, D32GR, D32N, K33N K33Q, E34A, K48E, Q49R, E51K, E51D, D52G, D58N, Y59H, N60T, N60S, L71P, R72G, R72Y или R72K.

[7] FOLR1 по любому из [1]-[6], где белок, связывающийся с FOLR1 представляет собой мультимер, включающий множество белков, связывающихся с FOLR1 в соответствии с любым из [1]-[6], предпочтительно димером белка, связывающегося с FOLR1, согласно любому из [1]-[6], более предпочтительно гомо димером белка, связывающегося с FOLR1 согласно любому из [1]-[6].

[8] Белок, связывающийся с FOLR1 согласно любому из [1]-[7], содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 1-45 и SEQ ID NO: 69-73, или выбранной из аминокислотных последовательностей идентичных им, по меньшей мере, на 90% соответственно.

[9] Белок, связывающийся с FOLR1 в соответствии с любым из [1]-[8], дополнительно содержащий один или несколько доменов связывания имеющий от 1 до 80 аминокислот, содержащих одно или несколько сайтов связывания для связывания химических групп, предпочтительно, где химические группы выбраны из хелаторов, лекарственных средств, токсинов, красителей и небольших молекул.

[10] Белок, связывающийся с FOLR1 в соответствии с любым из [1]-[9], дополнительно содержащий, по меньшей мере, один диагностически активный фрагмент, необязательно выбранный из радионуклида, флуоресцентного белка, фотосенсибилизатора, красителя или фермента, или любой комбинации, указанных выше.

[11] Белок, связывающийся с FOLR1 по любому из пунктов [1]-[9], дополнительно содержащий, по меньшей мере, одну терапевтически активную группу, необязательно выбранную из моноклонального антитела или его фрагмента, радионуклида, цитотоксического соединения, цитокина, хемокина, фермента или их производных, или любой комбинации, указанных выше.

[12] Белок, связывающийся с FOLR1 по любому из пунктов [1]-[11], дополнительно содержащий, по меньшей мере, одну группу, модулирующую фармакокинетику, необязательно выбранную из полиэтиленгликоля, сывороточного альбумина человека, белка, связывающегося с альбуминомилипептида, белка, связывающийся с иммуноглобулином, или пептид, или иммуноглобулин, или фрагмента иммуноглобулина,

полисахарида или неструктурированной аминокислотной последовательности, содержащей аминокислоты аланин, глицин, серин, пролин.

[13] Белок, связывающийся с FOLR1 по любому из пунктов [1]-[12] для использования в диагностике или лечении опухолей, связанных с FOLR1, предпочтительно для визуализации опухолей и лучевой терапии опухолей, связанных с FOLR1.

[14] Композиция, содержащая белок, связывающийся с FOLR1 согласно любому из [1]-[13], для использования в медицине, предпочтительно для использования в диагностике или лечении опухолей, связанных с FOLR1, предпочтительно для визуализации опухолей и лучевой терапии опухолей, связанных с FOLR1.

[15] Способ получения белка, связывающегося с FOLR1, в соответствии с любым из [1]-[13], включающий стадии, а) культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для получения указанного белка, связывающегося с FOLR1 и б) выделения указанного белка, связывающегося с FOLR1.

Это краткое изложение неисчерпывающе описывает все особенности настоящего изобретения. Другие варианты осуществления становятся явными из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На чертежах показано:

ФИГ. 1 показывает выбранные аминокислотные последовательности белков, связывающихся с рецептором фолиевой кислоты, альфа (FOLR1). Отличия от убиквитина (SEQ ID NO: 46) показаны серым цветом. Цифры в верхнем ряду относятся к соответствующему положению в SEQ ID NO: 46.

ФИГ. 2. Связывание Affilin-199490 (гомодимер Affilin-197556b) с высоким сродством к FOLR1. Анализ при помощи метода без меточного взаимодействия с использованием SPR (Biacore). FOLR1 был им мобилизован на чипе CM-5. Линии показывают разные концентрации: 0, 0, 1, 0, 3, 0, 93, 2, 77, 8, 3, 25 и 75 нМ. После сопоставления данных с моделью Ленгмюра 1:1 для Affilin-199490 было рассчитано значение KD менее 0,5 нМ.

ФИГ. 3. Отсутствует связывание Affilin-199490 с FOLR2 (рецептор фолиевой кислоты бета), но присутствует специфическое связывание с FOLR1 (рецептор фолиевой кислоты альфа). Анализ при помощи метода без меточного взаимодействия с использованием SPR (Biacore).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения разработали решение для удовлетворения острой постоянной потребности в данной области в расширении медицинских возможностей для диагностики и лечения рака путем предоставления новых белков, связывающихся с FOLR1. Белки, специфические для FOLR1, как определено здесь, функционально характеризуются высокой специфической аффинностью к FOLR1, но не к FOLR2. В частности, изобретением предлагаются белки, связывающиеся с FOLR1, на основе мутеинов убиквитина (также известных как молекулы Affilin®). Белки, белки, связывающиеся с FOLR1, как описано здесь, обеспечивают молекулярные форматы с благоприятными физико-химическими свойствами, высоким уровнем экспрессии в бактериях и получают простыми способами. Новые белки, связывающиеся с FOLR1, могут расширить неудовлетворенные до сих пор медицинские стратегии диагностики и лечения рака, связанного с FOLR1. В частности, белки, связывающиеся с FOLR1, можно использовать для целей визуализации, например, для выявления опухолевых клеток, экспрессирующих FOLR1, и для лучевой терапии опухолей, экспрессирующих FOLR1.

Прежде чем настоящее изобретение будет описано более подробно ниже, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в данном документе, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных аспектов и вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который отражен прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит это изобретение. Сюда входят квалифицированные специалисты, работающие в области инженерии и очистки белков, а также квалифицированные специалисты, работающие в области разработки новых связывающих молекул, специфичных для мишеней, для использования в технических целях, а также в терапии и диагностике.

Предпочтительно используемые здесь термины определяются так, как описано в «Многоязычном глоссарии биотехнологических терминов: (Рекомендации IUPAC)», Leuenberger, H. G. W, Nagel, B. and Kцlbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Базель, Швейцария).

Во всем данном описании и формуле изобретения, которые следуют ниже, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и

«содержащий», понималось как подразумевающее включение указанной единицы или шага, или группы единиц или шагов, но не исключение любого другой единицы, шага или группы единиц или шагов. Термин «содержит(-ат)» или «содержащий» может охватывать ограничение «состоит из» или «состоящий из», если такое ограничение необходимо по какой-либо причине и в любой степени.

Несколько документов (например: патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителя, инструкции, номера представленных последовательностей в GenBank и т. Д.) могут быть процитированы по всему тексту этого описания. Ничто в данном документе не должно толковаться как признание того, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения. Некоторые из документов, цитируемых в данном документе, можно охарактеризовать как «включенные посредством ссылки». В случае противоречия между определениями или идеями таких включенных ссылок и определениями или идеями, изложенными в настоящем описании, текст настоящего описания имеет преимущественную силу.

Все упомянутые здесь последовательности раскрыты в прилагаемом списке последовательностей, который со всем своим содержанием и описанием составляет часть описания содержания настоящего описания.

ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЖНЫХ ТЕРМИНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ЗАЯВКЕ

Термин «FOLR1» или «рецептор фолиевой кислоты альфа» в контексте настоящего описания относится к инвентарному номеру Uniprot P15328, в частности остаткам 25-234. Термин «FOLR1» включает все полипептиды, имеющие идентичность последовательностей по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96% или 97% или более, или на 100% с FOLR1 регистрационного номера Uniprot P15328 (человека), в частности остатки 25-234, или инвентарный номер Uniprot P35846 (мышь).

Термин «FOLR2» или «бета-рецептор фолиевой кислоты» в контексте настоящего описания относится к инвентарному номеру Uniprot P14207 или к соответствующим белкам у других видов.

Термин «белок, связывающийся с FOLR1» относится к белку с высоким сродством связывания с FOLR1.

Термины «белок» и «полипептид» относятся к любой цепи из двух или более аминокислот, связанных пептидными связями, и не относятся к конкретной длине продукта. Таким образом, «пептиды», «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи из двух или более аминокислот, включены в

определение «полипептид», а термин «полипептид» может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин «полипептид» также предназначен для обозначения продуктов пост трансляционных модификаций полипептида, которые хорошо известны в данной области.

Термин «модификация» или «модификация аминокислоты» относится к замене, делеции или вставке эталонной аминокислоты в конкретном положении в последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Учитывая известный генетический код, а также методы рекомбинантной и синтетической ДНК, квалифицированный ученый может легко сконструировать ДНК, кодирующие варианты аминокислот.

Используемый здесь термин «мутеин» относится к производным, например, убиквитина, как показано в SEQ ID NO: 46, или аналогичных белков, которые отличаются от указанной аминокислотной последовательности заменами аминокислот, вставками, делециями или любой их комбинацией, при условии, что мутеин обладает специфической аффинностью связывания с FOLR1.

Термин «Affilin®» (зарегистрированная торговая марка Navigo Proteins GmbH) относится к связывающим белкам, несвязанным с иммуноглобулином.

Под термином «замена» понимается замена аминокислоты другой аминокислотой. Термин «вставка» включает добавление аминокислот к исходной аминокислотной последовательности.

Термин «убиквитин» относится к убиквитину в соответствии с SEQ ID NO: 46 и к белкам, имеющим идентичность последовательности по меньшей мере 95%, например, с точечными мутациями в положениях 45, 75, 76, которые не влияют на связывание с мишенью (FOLR1).

Термины «аффинность связывания» и «активность связывания» могут использоваться здесь взаимозаменяемо, и они относятся к способности полипептида связываться с другим белком, пептидом или его фрагментом, или доменом. Средство связывания обычно измеряют и сообщают с помощью константы диссоциации (KD), которая используется для оценки и ранжирования сил бимолекулярных взаимодействий.

Термин «слитый белок» относится к белку, содержащему по меньшей мере первый белок, генетически связанный по меньшей мере со вторым белком. Слитый белок создается путем объединения двух или более генов, которые изначально кодировали отдельные белки. Слитые белки могут дополнительно содержать дополнительные домены, которые не участвуют в связывании мишени, такие как, но не ограничиваясь ими,

например, мультимеризационные фрагменты, полипептидные метки, полипептидные линкеры или фрагменты, связывающиеся с мишенью, отличной от FOLR1.

Термин «идентичность аминокислотной последовательности» относится к количественному сравнению идентичности (или различий) аминокислотных последовательностей двух или более белков. «Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Чтобы определить идентичность последовательности, последовательность анализируемого белка выравнивают с последовательностью эталонного белка или полипептида. Способы выравнивания последовательностей хорошо известны в данной области. Например, для определения степени идентичности аминокислотной последовательности произвольного полипептида относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46 предпочтительно использовать программу локального сходства SIM, известную в данной области. Для анализа множественного совмещения предпочтительно использовать Clustal Omega, как известную специалистам в данной области.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Структурная характеристика белков, связывающихся с FOLR1.

Белок, связывающийся с FOLR1, как здесь определено, включает мутеин убиквитина. Белок, связывающийся с FOLR1 содержит аминокислоту на основе убиквитина в соответствии с SEQ ID NO: 46 с заменами по крайней мере в положениях 9, 10, 12, 42, 44, 46, 62, 63, 64, 65, 66, 68 и 70.

В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, имеет по меньшей мере 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% или 79% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46.

В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46. Белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, имеет по меньшей мере 81%, 82%, 83%, 84% или 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46.

В предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может иметь любую аминокислотную идентичность от 70% идентичности до 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46. В еще более предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может иметь любую аминокислотную идентичность от 73% идентичности до 83% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46. В еще более предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может иметь любую аминокислотную идентичность от 75% идентичности до 83% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46. В еще более предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может иметь любую аминокислотную идентичность от 76% идентичности до 83% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46. В еще более предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может иметь любую аминокислотную идентичность от 79% идентичности до 83% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46.

Белок, связывающийся с FOLR1, как здесь определено, включает мутеин SEQ ID NO: 46, т. е. содержит мутеин убиквитина. Белок, связывающийся с FOLR1 содержит аминокислоту на основе SEQ ID NO: 46 с заменами по крайней мере в положениях 9, 10, 12, 42, 44, 46, 62, 63, 64, 65, 66, 68 и 70. Белок, связывающийся с FOLR1, как определено в данном документе, аминокислота, соответствующая положению 9 в SEQ ID NO: 46, представляет собой E, L, S или N, положению 10 в SEQ ID NO: 46 представляет собой E, Q, Y или I, положению 12 в SEQ ID NO: 46 представляет собой Y, E, W или D, положению 42 в SEQ ID NO: 46 представляет собой E, K, Y, Q или M, положению 44 в SEQ ID NO: 46 представляет собой L, Y, V, или F, положению 46 в SEQ ID NO: 46 представляет собой Y, D или S, положению 62 в SEQ ID NO: 46 представляет собой L, R, D или I, положению 63 в SEQ ID NO: 46 представляет собой G, F, L или A, положению 64 в SEQ ID NO: 46 представляет собой G, D или Y, положению 65 в SEQ ID NO: 46 представляет собой A, D, Y, G или M, положению 66 в SEQ ID NO: 46. Представляет собой V, H, Y или T, положению 68 в SEQ ID NO: 46 представляет собой K, D, P или T, а положению 70 в SEQ ID NO: 46 представляет собой Q, P, T, W или H, и необязательно дополнительно замещены одна или несколько, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах реализации аминокислота, соответствующая положению

11 в SEQ ID NO: 46, представляет собой K или R, а положению 45 в SEQ ID NO: 46 представляет собой W, R или G.

Структурная характеристика по аминокислотным мотивам. В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 9, 10, 11 и 12 убиквитина, как определено в SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы EEKY, EERY, EQKY, LYKE, SYKW или NIKD (SEQ ID NO: 61-66).

В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 42, 43, 44, 45 и 46 SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы ELLWY, KLLWY, KLLRY, YLYWD, YLYGD, QLVWD или MLFWS (SEQ ID NO: 54-60).

В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70 SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы LGGAVLKLQ, LGDAVLKLQ, LGGAVLKLP, RFGDHLDLT, RFGYHLDLT, DLGGYLPLW или IAYMTLTLH (SEQ ID NO: 47-53).

В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 9, 10, 11 и 12 убиквитина, как определено в SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы EEKY, EERY, EQKY, LYKE, SYKW или NIKD, и мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 42, 43, 44, 45 и 46 SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы ELLWY, KLLWY, KLLRY, YLYWD, YLYGD, QLVWD или MLFWS, и мотив аминокислотного остатка в положениях, соответствующих положениям 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70 SEQ ID NO: 46, где мотив аминокислотного остатка выбран из группы LGGAVLKLQ, LGDAVLKLQ, LGGAVLKLP, RFGDHLDLT, RFGYHLDLT, DLGGYLPLW или IAYMTLTLH.

В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит аминокислотные мотивы, выбранные из EEKY, ELLWY и LGGAVLKLQ; EEKY, KLLWY и LGGAVLKLQ или LGGAVLKLP или LGDAVLKLQ; EERY, KLLWY и LGGAVLKLQ или LGDAVLKLQ; EEKY, KLLRY и LGGAVLKLQ; RLYKE, YLYWD и RFGDHLDLT или RFGYHLDLT; RLYKE, YLYGD и RFGYHLDLT; ESYKW, QLVWD и DLGGYLPLW; или YNIKD, MLFWS и IAYMTLTLH в положениях, соответствующих положениям 9-12, 42-46 и 62-70 убиквитина, как определено в SEQ ID NO: 46, как показано в **таблице 1**.

Таблица 1. Аминокислоты белков, связывающихся с FOLR1 в выбранных положениях

Цифры в верхнем ряду относятся к соответствующему положению в SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO	9	10	11	12	42	43	44	45	46	62	63	64	65	66	67	68	69	70
1	E	E	K	Y	E	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
2, 30, 31	E	E	K	Y	E	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
3	E	E	K	Y	E	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
4, 32, 33	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
5, 34, 35	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
6, 36, 37	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
7	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
12	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
14	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
15	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
16	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
23	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
17	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	D	A	V	L	K	L	Q
11	E	E	K	Y	K	L	L	R	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
19	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	P
21	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	P
22	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	P
8	E	E	R	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
9	E	E	R	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
18, 38-41	E	E	R	Y	K	L	L	W	Y	L	G	D	A	V	L	K	L	Q
69	E	Q	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
70	E	Q	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
71, 72, 73	E	Q	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	P
10	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
13	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	Q
20, 42, 43	E	E	K	Y	K	L	L	W	Y	L	G	G	A	V	L	K	L	P
24	L	Y	K	E	Y	L	Y	W	D	R	F	G	D	H	L	D	L	T
25	L	Y	K	E	Y	L	Y	G	D	R	F	G	D	H	L	D	L	T
26	L	Y	K	E	Y	L	Y	W	D	R	F	G	Y	H	L	D	L	T
27	L	Y	K	E	Y	L	Y	W	D	R	F	G	Y	H	L	D	L	T
28	S	Y	K	W	Q	L	V	W	D	D	L	G	G	Y	L	P	L	W
29	N	I	K	D	M	L	F	W	S	I	A	Y	M	T	L	T	L	H

В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 содержит дополнительные замены в 1, 2, 3, 4, 5 аминокислотных положениях, выбранных из положений, соответствующих положениям 6, 8, 13, 14, 20, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 48, 49, 51, 52, 58, 59, 60, 71 и 72 из SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах реализации замены выбраны из любой одной из группы K6V, K6Q, L8R, L8E, L8Y, I13T, T14A, T14P, S20C, S20G, I23T, I23V, E24G, E24A, N25D, K29R, K29E, K29T, I30V, I30L, Q31R, D32G, D32N, K33R, K33Q, K48E, Q49R, E51K, E51D, D52G, D58N, Y59H, N60T, N60S, L71P, R72G, R72Y и R72K, предпочтительно где белок, связывающийся с FOLR1, содержит аминокислоту с идентичностью последовательности от 70% до 85% от SEQ ID NO: 46, предпочтительно от 75% до 83% от SEQ ID NO: 46, предпочтительно от 76% до 83% от SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из Y59H (например, см. SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах реализации дополнительные

замены выбраны из E24A (например, см. SEQ ID NO: 1; 81, 6% идентичность последовательности с SEQ ID: 46; 14 аминокислот, модифицированных из 76 аминокислот). В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из любой группы K29R и K48E (например, см. SEQ ID NO: 4; 80, 3% идентичности последовательности с SEQ ID: 46; 15 аминокислот, модифицированных из 76 аминокислот). В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из любой одной группы T14A, I30V и K48E (например, см. SEQ ID NO: 2) (78, 9% идентичности последовательности с SEQ ID: 46; 16 модифицированных аминокислот; см., например, димер SEQ ID NO: 2, как показано в SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из любой из группы K6V, L8R и R72G (например, см. SEQ ID NO: 24; 78, 9% идентичности последовательности с SEQ ID: 46; 16 модифицированных аминокислот). В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из любой из группы K6V, L8R, W45G, R72G (например, см. SEQ ID NO: 25; 77, 6% идентичности последовательности с SEQ ID: 46; модифицировано 17 аминокислот). В некоторых вариантах реализации дополнительные замены выбраны из любой из группы K6V, L8R, I13T, T14A, R72G (например, см. SEQ ID NO: 27; 76, 3% идентичности последовательности с SEQ ID: 46; модифицировано 18 аминокислот.

Дополнительные примеры представлены на ФИГ. 1.

Структурная характеристика по незамещенным положениям в SEQ ID NO: 46.

В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, дополнительно структурно отличается тем, что некоторые остатки не подвержены мутации, например, аминокислотные остатки, соответствующие положениям 1, 2, 3, 4, 5, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 47, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 61, 67, 69, 73, 74, 75, 76 из SEQ ID NO: 46 (убиквитин). Таким образом, в различных вариантах реализации аминокислотные остатки в положениях 1-5, 7, 15-19, 21, 22, 26-28, 35-41, 43, 47, 50, 53-57, 61, 67, 69, 71, 73-76 соответствуют аминокислоте, показанной в SEQ ID NO: 46.

Мультимеры. В предпочтительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1 представляет собой мультимер, состоящий из множества белков, связывающихся с FOLR1, как определено в данном документе. Мультимер может содержать два, три, четыре или более белков, связывающихся с FOLR1. В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1, содержит 2, 3, 4 или более белков, связывающихся с FOLR1, связанных друг с другом, т. е. белок, связывающийся с FOLR1, может быть димером, тримером или тетрамером и т. Д. В некоторых вариантах реализации мультимер представляет собой димер белка, связывающегося с FOLR1, как определено выше. В

различных вариантах реализации Белок, связывающийся с FOLR1 представляет собой гомодимер. Гомодимерные белки, связывающие FOLR1, представляют собой белки, в которых два белка связывающих FOLR1 с идентичными аминокислотными последовательностями связаны друг с другом. Гомодимеры могут быть получены путем слияния двух идентичных белков любой одной из группы SEQ ID NO: 1-29 или любой из аминокислотных последовательностей с идентичностью по меньшей мере 90% с ними. Например, Белок, связывающийся с FOLR1 SEQ ID NO: 33 представляет собой гомодимер двух идентичных аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4. Выбранные примеры гомодимеров показаны в SEQ ID NO: 30-43 и в таблице. 2.

Таблица 2. Гомодимерные белки, связывающие FOLR1

SEQ ID NO:	<u>Affilin</u>	<u>Димер Affilin</u>	Линкер (аминокислоты)
31	199489	197556b (SED ID NO: 2)	0
30	199490	197556b (SED ID NO: 2)	16
33	199483	196962 (SED ID NO: 4)	0
32	199484	196962 (SED ID NO: 4)	16
35	199487	197525 (SED ID NO: 5)	0
34	199488	197525 (SED ID NO: 5)	16
37	199477	187731 (SEQ ID NO:6)	0
36	199478	187731 (SEQ ID NO: 6)	16
43	199485	197014 (SED ID NO: 20)	0
42	199486	197014 (SED ID NO: 20)	16
38	199479	196934 (SED ID NO: 18)	0
39	199480	196934 (SED ID NO: 18)	10
40	199481	196934 (SED ID NO: 18)	16
41	199482	196934 (SED ID NO: 18)	20

В других вариантах реализации мультимер представляет собой гетеродимер, например две аминокислотные последовательности белков FOLR1 специфических к Affilin имеют разные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах реализации два или более белка, связывающих FOLR1 связаны напрямую. В некоторых вариантах реализации два или более белка, связывающих FOLR1 связаны пептидным линкером. В различных вариантах реализации два или более белка, связывающих FOLR1 связаны через пептидный линкер, содержащий до 30 аминокислот. В других вариантах реализации два или более белка, связывающих FOLR1 связаны через пептидный линкер из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот. В одном варианте осуществления два связывающих белка FOLR1 связаны 16 аминокислотами, предпочтительно, два идентичных белка, связывающих FOLR1, связаны 16 аминокислотами.

Один вариант осуществления относится к линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глицин, серин, аланин или пролин. Линкер может состоять из глицина и серина и может быть богатым глицином (например, более 50% остатков в линкере могут быть остатками глицина). В некоторых вариантах реализации два или более белка, связывающих FOLR1 связаны через пептидный линкер аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 67 или пептидные линкеры с 90% идентичностью к ней. Могут быть использованы и другие линкеры для слияния белков известные в данной области.

Белок, связывающийся с FOLR1, как описано в данном документе, включает, по существу, состоит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 1-45 и SEQ ID NO: 69-74 или выбранной из аминокислотных последовательностей с имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности к нему соответственно. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, содержит аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 (Affilin-197556b). Например, SEQ ID NO: 1-23 и SEQ ID NO: 30-43 и SEQ ID NO: 69-74 содержат аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, содержит аминокислотную последовательность, которая проявляет по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24 (Affilin-189864). Например, SEQ ID NO: 25-27 по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 2. В некоторых дополнительных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, содержит аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 (Affilin-187803) или SEQ ID NO: 28 (Affilin-187770). Например, но не ограничиваясь этим, выбранные белки, связывающие FOLR1, показаны на **Фигуре 1**.

Функциональная характеристика. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как описано в данном документе, связывается с FOLR1, экспрессируемым на клетках, как определено с помощью FACS, и/или имеет аффинность связывания с FOLR1, равную 500 нМ или менее, как определено при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах реализации описанный здесь белок, связывающийся с FOLR1 имеет аффинность связывания (KD) менее 500 нМ для FOLR1. Белки, связывающие FOLR1 связывают FOLR1 с измеряемой аффинностью связывания менее

500 нМ, менее 200 нМ, менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 20 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ и более предпочтительно менее чем 1 нМ. Соответствующие методы известны специалистам в данной области или описаны в литературе. Способы определения аффинности связывания известны сами по себе и могут быть выбраны, например, из следующих методов, известных в данной области: иммуноферментный анализ (ELISA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ кинетического исключения (анализ KinExA), интерферометрия Bio-layer (BLI), проточная цитометрия, методы флуоресцентной спектроскопии, изотермическая калориметрия титрования (ИТС), аналитическое ультрацентрифугирование, радиоиммуноанализ (RIA или IRMA) и усиленная хемилюминесценция (ECL). Некоторые из методов описаны в примерах ниже. Обычно константа диссоциации KD определяется при 20°C, 25°C или 30°C. Если специально не указано иное, приведенные здесь значения KD определены при 25°C с помощью SPR. Чем ниже значение KD, тем выше аффинность связывания биомолекулы с ее партнером по связыванию. Чем выше значение KD, тем слабее связываются партнеры по связыванию друг с другом. Примеры аффинностей связывания белков, связывающихся с FOLR1 с FOLR1, представлены в Таблице 4 (см. Пример 5).

В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как описано в данном документе, имеет аффинность специфического связывания (KD) менее 500 нМ для FOLR1, но не для FOLR2. В некоторых вариантах реализации, белок, связывающийся с FOLR1 (рецептор фолиевой кислоты альфа), как описано в настоящем документе, специфически связывается с FOLR1, но не обнаруживает связывания с FOLR2 (рецептор фолиевой кислоты бета), как определено при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса (см. ФИГ. 3) и как проверено на FOLR2, экспрессирующие клеточные линии, как описано далее в Примерах (см. Пример 6). Таким образом, связывание белка, связывающегося с FOLR1, как описано в данном документе, является высокоспецифичным. FOLR1 и FOLR2 представляют собой изоформы рецепторов фолиевой кислоты с низкой степенью гомологии (менее 80%) и различным паттерном экспрессии. FOLR1 в основном экспрессируется на злокачественных раковых клетках, тогда как FOLR2 экспрессируется на активированных макрофагах в местах воспаления. Высокое избирательное связывание с FOLR1 может быть важным для целевых медицинских применений для рака, связанного с FOLR1, но не для воспаления, и может иметь снижение потенциальных токсических побочных эффектов.

В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, описанный в настоящем документе, связывается с FOLR1, но не обнаруживает связывания с

человеческим Fc-доменом иммуноглобулина IgG1, как определено при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса.

Половина максимальной эффективной концентрации EC50 указывает на концентрацию белка, связывающегося с FOLR1, которая вызывает ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия и, таким образом, представляет концентрацию белка, связывающегося с FOLR1, при которой наблюдается 50% его максимума. в случае половинной максимальной интенсивности сигнала флуоресценции связывания клеток, в эксперименте с проточной цитометрией. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как описано в настоящем документе, имеет EC50 менее 100 нМ для клеток экспрессирующих FOLR1, менее 50 нМ, менее 20 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ и более предпочтительно менее 1 нМ. . В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как описано в настоящем документе, имеет EC50 к FOLR1 менее 1 нМ после инкубации в присутствии мышиной сыворотки в течение по меньшей мере 24 ч при 37°C. Соответствующие методы известны специалистам в данной области. Чем ниже значение EC50, тем больше связывание белка, связывающегося с FOLR1, с самим FOLR1. Примеры белков, связывающихся с FOLR1, которые стабильны даже в присутствии сыворотки, представлены в Таблице 5 (см. Пример 9) и Таблице 6 (см. Пример 10).

В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, описанный в настоящем документе, стабилен при высоких температурах, предпочтительно от 62°C до 87°C. Для анализа стабильности, например, спектроскопические или основанные на флуоресценции методы в связи с химическим или физическим разворачиванием, известны специалистам в данной области. Например, используя стандартные методы, стабильность молекулы может быть определена путем измерения температуры термического плавления (Tm), температуры в градусах Цельсия (° C), при которой половина молекул разворачивается. Обычно чем выше Tm, тем стабильнее молекула. Температурную стабильность определяли методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), как более подробно описано в Примере 4 и в Таблице 3.

Сайты связывания. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, описанный в настоящем документе, дополнительно содержит один или несколько сайтов связывания для связывания химических фрагментов. Сайт связывания способен реагировать с другими химическими группами для связывания белка, связывающегося с FOLR1, с химическими фрагментами. Определенное количество и определенное положение сайтов связывания делает возможным сайт-специфическое связывание химических фрагментов со связывающимися белками FOLR1, как описано в данном

документе. Таким образом, при необходимости с белком, связывающим FOLR1, может быть связано большое количество химических фрагментов. Количество сайтов связывания может быть отрегулировано до оптимального количества для определенной задачи специалистом в данной области, чтобы соответствующим образом отрегулировать количество химических фрагментов. В выбранных вариантах осуществления сайт-связывания может быть выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, которые могут быть помечены определенным химическим составом, например, одним или несколькими остатками цистеина, одним или несколькими остатками лизина, одним или несколькими остатками тирозина, о одним или несколькими остатками триптофаном. Остатки или один или несколько остатков гистидина. Белок, связывающийся с FOLR1, может содержать от 1 до 20 сайтов связывания, предпочтительно от 1 до 6 сайтов связывания, предпочтительно 2 сайта связывания или предпочтительно один сайт связывания.

Домены связывания. Один вариант осуществления предлагает белок, связывающийся с FOLR1, который содержит по меньшей мере один домен связывания из 1-80 аминокислот, содержащий один или несколько сайтов связывания. В некоторых вариантах реализации домен связывания из 1-80 аминокислот может включать аланин, пролин или серин, а в качестве сайта связывания - цистеин. Примеры связывающих FOLR1 белков с доменом связывания представлены в SEQ ID NO: 44 и 45 (домен связывания из 3 аминокислот «SAC», сайт связывания представляет собой цистеин). В других вариантах осуществления домен связывания из 5-80 аминокислот может состоять из аланина, пролина, серина и цистеина в качестве сайта связывания. В одном варианте осуществления домен связывания состоит из 20-60% аланина, 20-40% пролина, 10-60% серина и одного или более цистеина в качестве сайта(ов) связывания на С- или N-конце белка, связывающийся с FOLR1, как описано здесь. В некоторых вариантах реализации аминокислоты аланин, пролин и серин случайным образом распределены по всей аминокислотной последовательности домена связывания, таким образом, что не более чем максимум 2, 3, 4 или 5 идентичных аминокислотных остатков находятся рядом, преимущественно максимум 3 аминокислоты. Состав от 1 до 20 доменов связывания может быть различным или идентичным.

В некоторых вариантах осуществления химические фрагменты выбраны из хелаторов, лекарственных средств, токсинов, красителей и небольших молекул. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна из химических групп представляет собой хелатор, разработанный как комплексообразующий агент для связывания одной или нескольких дополнительных группировок с целевым соединением с

белком, связывающим FOLR1, как это описано в данном документе. Один вариант осуществления относится к белку, связывающему FOLR1, где хелатор представляет собой комплексобразующий агент для связывания одного или нескольких радиоизотопов или других детектируемых меток, как описано в примерах (Примеры 7-10).

Диагностический фрагмент. В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1 дополнительно содержит диагностический фрагмент. В других вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1 дополнительно содержит более одного диагностического фрагмента. В некоторых вариантах реализации такой диагностический фрагмент может быть выбран из радионуклидов, флуоресцентных белков, фотосенсибилизаторов, красителей или ферментов или любой комбинации указанных выше. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, который содержит по меньшей мере один диагностический фрагмент, может использоваться, например, в качестве средств визуализации, например, для оценки присутствия опухолевых клеток или метастазов, распределения опухоли и/или рецидива опухоли. Методы обнаружения или мониторинга раковых клеток включают методы визуализации. Такие методы включают визуализацию раковых клеток, связанных с FOLR1, например, с помощью визуализации с использованием радиоактивных меток, фотолюминесценции или флуоресценции.

Терапевтический фрагмент. В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, дополнительно содержит терапевтически активную часть. В других вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1 дополнительно содержит более одного терапевтически активного фрагмента. В некоторых вариантах реализации такой терапевтически активный фрагмент может быть выбран из моноклонального антитела или его фрагмента, внеклеточного домена рецептора или его фрагментов, радионуклида, цитотоксического соединения, цитокина, хемокина, фермента или их производных, или любой комбинации указанных выше. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, который содержит терапевтически активный компонент, может использоваться для направленной доставки любого из перечисленных выше компонентов в опухолевую клетку, экспрессирующую FOLR1, и накапливаться в ней, что приводит к низким уровням токсичности для нормальных клеток.

Радионуклиды. Подходящие радионуклиды для применения в визуализации *in vivo* или *in vitro* или для лучевой терапии включают, например, но не ограничиваясь ими, группу гамма-излучающих изотопов, группу позитронных излучателей, группу бета-излучателей и группу альфа-излучателей. В некоторых вариантах реализации подходящие партнеры конъюгации включают хелаторы, такие как 1, 4, 7, 10-тетраазациклододекан-1,

4, 7, 10-тетрауксусная кислота (DOTA) или диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) или их активированные производные, наночастицы и липосомы. В различных вариантах осуществления DOTA может подходить в качестве комплексообразующего агента для радиоизотопов и других агентов для визуализации, как более подробно описано в примерах.

Фрагмент, модулирующий фармакокинетику. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1 дополнительно содержит по меньшей мере один фрагмент, модулирующий фармакокинетику, необязательно выбранный из полиэтиленгликоля, сывороточного альбумина человека, пептида связывающегося с альбумином, связывающегося с иммуноглобулинпептида или иммуноглобулина или фрагментов иммуноглобулина или полисахарида (для например, гидроксилэтилкрахмал), или неструктурированная аминокислотная последовательность, которая увеличивает гидродинамический радиус, такая как мультимер, содержащий аминокислоты аланин, глицин, серин, пролин. В различных вариантах реализации указанный фрагмент увеличивает время полураспада белка, связывающегося с FOLR1, по меньшей мере в 1, 5 раза. В данной области известны несколько методов получения белка, связывающегося с FOLR1, с увеличенным периодом полураспада, например, прямое слияние фрагмента, модулирующего фармакокинетику, с белком, связывающим FOLR1, как описано выше, или способы химического связывания. Фрагмент, модулирующий фармакокинетику, может быть присоединён, например, к одному или нескольким сайтам белка, связывающегося с FOLR1, через пептидную линкерную последовательность или через сайт связывания, как описано выше.

Конъюгирование белковых или небелковых фрагментов с белком, связывающим FOLR1, может быть выполнено с применением химических методов, хорошо известных в данной области. В некоторых вариантах реализации могут применяться специфические химические процессы связывания, для дериватизации остатков цистеина или лизина. Химическое связывание может быть выполнено с помощью химических процессов, хорошо известных специалисту в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленными, химические процессы замещения, присоединения или циклоприсоединения или окисления (например, образование дисульфида).

Молекулы для очистки/обнаружения. В некоторых вариантах реализации дополнительные аминокислоты могут простираться либо на N-конце белка, связывающегося с FOLR1, либо на C-конце, либо на обоих его концах. Дополнительные последовательности могут включать, например, введенные последовательности, например для очистки или обнаружения. В одном варианте осуществления дополнительные

аминокислотные последовательности включают одну или несколько пептидных последовательностей, которые придают аффинность определенным материалам хроматографической колонки. Типичные примеры таких последовательностей включают, без ограничения, Strep-Tag, олигогистидиновые метки, глутатион-S-трансферазу, белок, связывающийся с мальтозой, интеины, фрагменты интеина или домен белка G связывающийся с альбумином. Пример белка, связывающегося с FOLR1, со Strep-Tag представлен в SEQ ID NO: 45.

Использование в медицине. Различные варианты осуществления относятся к белку, связывающемуся FOLR1, как это описано в данном документе, для использования в медицине. В одном варианте осуществления белок, связывающийся с FOLR1 используется в медицине для диагностики или лечения рака, связанного с экспрессией FOLR1. Белки, связывающие FOLR1, как это описано в настоящем документе, делают возможной селективную диагностику и лечение раковых клеток или раковых тканей, связанных с FOLR1. Известно, что FOLR1 активируется в опухолевых клетках, что может приводить к неконтролируемому росту опухолевых клеток и образованию метастазов. Примерами опухолей, связанных с FOLR1, являются рак яичников, эндометрия, мозга, легких, почек, головы и шеи, груди, желудка и толстой и прямой кишки.

Один вариант осуществления представляет собой способ диагностики (включая мониторинг) субъекта, имеющего рак, связанный с FOLR1, способ диагностики (мониторинга), включающий введение субъекту белка, связывающегося с FOLR1, как это описано, необязательно конъюгированного с радиоактивными молекулами. В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может быть использован для диагностики рака, связанного с FOLR1, необязательно, где белок, связывающийся с FOLR1 конъюгирован с радиоактивной молекулой. В некоторых вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, можно использовать в качестве биомаркера. В некоторых вариантах реализации способы визуализации с использованием белка, связывающегося с FOLR1, с метками, такими как радиоактивные или флуоресцентные, могут применяться для визуализации FOLR1 на конкретных тканях или клетках, например, для оценки наличия опухолевых клеток, связанных с FOLR1, распределения опухолей, связанных с FOLR1, рецидива FOLR1. Связанной опухолью, и/или для оценки реакции пациента на лечение.

Еще один вариант осуществления представляет собой способ лечения субъекта, страдающего раком, связанным с FOLR1, причем способ лечения включает введение субъекту специфического белка, связывающегося с FOLR1, как описано, необязательно

конъюгированного с радиоактивной молекулой и/или цитотоксическим агентом. В различных вариантах реализации белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, может быть использован для лечения рака, связанного с FOLR1, необязательно, где белок, связывающийся с FOLR1 конъюгирован с цитотоксическим агентом и/или с радиоактивной молекулой и/или экспрессируется на поверхности специфической CaT клеток. Некоторые варианты осуществления относятся к применению белка, связывающегося с FOLR1, меченного подходящим радиоизотопом или цитотоксическим соединением, или к лечению опухолевых клеток, связанных с FOLR1, в частности, для контроля или уничтожения опухолевых клеток, связанных с FOLR1, например злокачественных клеток. В следующем варианте лечебные дозы излучения селективно доставляются к опухолевым клеткам, родственным FOLR1, но не к нормальным клеткам.

Специфические белки, связывающие FOLR1, как это описано в настоящем документе, могут использоваться для направленной на опухоль терапии или диагностики без распознавания воспаленных тканей. Благодаря специфическому связыванию с FOLR1 (а не с FOLR2), терапия, направленная на опухоль FOLR1, например, у пациентов с аутоиммунными заболеваниями или пациентов, страдающих воспалением, может быть благоприятной.

Композиции. Различные варианты осуществления относятся к композиции, содержащей белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в данном документе. Композиция, содержащая белок, связывающийся с FOLR1, как определено выше, для использования в медицине, предпочтительна для использования в диагностике или лечении различных раковых опухолей, связанных с FOLR1, таких как яичники, эндометрий, головной мозг, легкие, почки, голова и шея, грудь, желудок, рак толстой и прямой кишки и т. д., преимущественно рак яичников, груди и легких. Композиции, содержащие белок, связывающийся с FOLR1, как это описано выше, можно использовать для клинических применений как для диагностических, так и для терапевтических целей. В частности, композиции, содержащие белок, связывающийся с FOLR1, как это описано выше, могут быть использованы для клинических применений для визуализации, мониторинга и устранения или инактивации патологических клеток, экспрессирующих FOLR1.

Различные варианты реализации относятся к диагностической композиции для диагностики рака, связанной с FOLR1, содержащей белок, связывающийся с FOLR1, как определено в данном документе, и носитель приемлемый для использования в диагностике и/или разбавитель. Они включают, например, стабилизирующие агенты,

поверхностно-активные агенты, соли, буферы, красители и т. д., но не ограничиваются ими. Композиции могут быть в форме жидкого препарата, лиофилизата, гранул, в форме эмульсии или липосомального препарата.

Диагностическая композиция, содержащая белок, связывающийся с FOLR1, как описано в данном документе, может использоваться для диагностики рака, связанного с FOLR1, как описано выше.

Различные варианты осуществления относятся к фармацевтической (например, терапевтической) композиции для лечения заболеваний, содержащей белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в настоящем документе, и фармацевтически (например, терапевтически) приемлемый носитель и/или разбавитель. Фармацевтическая (например, терапевтическая) композиция необязательно может содержать дополнительные вспомогательные агенты и наполнители, известные сами по себе. Они включают, например, стабилизирующие агенты, поверхностно-активные агенты, соли, буферы, красители и т. д., но не ограничиваются ими.

Фармацевтическая композиция, содержащая белок, связывающийся с FOLR1, как определено здесь, может использоваться для лечения заболеваний, как описано выше.

Композиции содержат эффективную дозу белка, связывающегося с FOLR1, как определено в данном документе. Количество вводимого белка зависит от организма, типа заболевания, возраста и веса пациента и других факторов, известных как таковые. В зависимости от галенового препарата эти композиции можно вводить парентерально путем инъекции или инфузии, системно, внутривенно, внутримышечно, подкожно, трансдермально или другими традиционно применяемыми способами применения.

Композиция может быть в форме жидкого препарата, лиофилизата, крема, лосьона для местного применения, аэрозоля, в форме порошков, гранул, в форме эмульсии или липосомального препарата. Тип препарата зависит от типа заболевания, пути введения, тяжести заболевания, пациента и других факторов, известных специалистам в данной области медицины.

Различные компоненты композиции могут быть упакованы в виде набора с инструкциями по применению.

Получение белков, связывающихся с FOLR1. Белки, связывающие FOLR1, как описано здесь, могут быть получены любым из многих традиционных и хорошо известных методов, таких как простые стратегии органического синтеза, методы твердофазного синтеза, методы легирования фрагментов или коммерчески доступные автоматизированные синтезаторы. С другой стороны, они также могут быть получены обычными методами рекомбинации отдельно или в сочетании с обычными

синтетическими методами. Кроме того, они также могут быть получены внеклеточной транскрипцией/трансляцией *in vitro*.

Различные варианты осуществления относятся к полинуклеотиду, кодирующему белок, связывающийся с FOLR1, как это описано в данном документе. Один вариант осуществления дополнительно предлагает вектор экспрессии, содержащий указанный полинуклеотид, и клетку-хозяин, содержащую указанный выделенный полинуклеотид или вектор экспрессии.

Различные варианты осуществления относятся к способу получения белка, связывающегося с FOLR1, как это описано в настоящем документе, включающему культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях, которые делают возможной экспрессию указанного белка, связывающегося с FOLR1 и необязательно выделение указанного белка, связывающегося с FOLR1.

Например, один или несколько полинуклеотидов, которые кодируют белок, связывающийся с FOLR1, могут быть экспрессированы в подходящем хозяине, и продуцированный белок, связывающийся с FOLR1, может быть выделен. Клетка-хозяин содержит указанную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор. Подходящие клетки-хозяева включают прокариоты или эукариоты. Вектор означает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), которые можно использовать для передачи информации, кодирующей белок, в клетку-хозяин. Различные системы культур клеток, например, но не ограничиваясь ими, млекопитающих, дрожжей, растений или насекомых, также можно использовать для экспрессии рекомбинантных белков. Подходящие условия для культивирования прокариотических или эукариотических клеток-хозяев хорошо известны специалисту в данной области. Культивирование клеток и экспрессия белка с целью производства белка может осуществляться в любом масштабе, начиная от колб-шейкеров небольшого объема до больших ферментеров, с применением технологий, хорошо известных любому специалисту в данной области.

Один вариант осуществления относится к способу получения связывающегося белка, как подробно описано выше, указанный способ включает следующие стадии: (a) получение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, связывающийся с FOLR1, как определено в данном документе; (b) введение указанной нуклеиновой кислоты в вектор экспрессии; (c) введение указанного вектора экспрессии в клетку-хозяин; (d) культивирование клетки-хозяина; (e) подвергание клетки-хозяина условиям культивирования, при которых экспрессируется белок, связывающийся с FOLR1 тем самым продуцируя белок, связывающийся с FOLR1 как определено в данном документе;

(f) необязательно выделение белка, связывающегося с FOLR1, полученного на стадии (e); и (g) необязательно конъюгирование белка, связывающегося с FOLR1, с дополнительными функциональными группами, как определено в данном документе.

В общем, выделение очищенного белка, связывающегося с FOLR1, из культуральной смеси может быть выполнено с использованием обычных методов и технологий, хорошо известных в данной области, таких как центрифугирование, осаждение, флокуляция, различные варианты хроматографии, фильтрация, диализ, концентрирование и их комбинации, и другие. Хроматографические методы хорошо известны в данной области и включают, без ограничения, ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию (эксклюзионную хроматографию), хроматографию гидрофобного взаимодействия или аффинную хроматографию.

Для упрощения очистки белок, связывающийся с FOLR1 может быть слит с другими пептидными последовательностями, имеющими повышенное сродство к разделяющим материалам. Предпочтительно выбирают такие слияния, которые не оказывают вредного воздействия на функциональность белка, связывающегося с FOLR1, или могут быть разделены после очистки за счет введения специфических сайтов расщепления протеазой. Такие методы также известны специалистам в данной области.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже Примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения. В частности, изобретение иллюстрируется конкретными модификациями убиквитина (SEQ ID NO: 46), приводящими к связыванию с FOLR1. Однако изобретение этим не ограничивается, и следующие примеры просто показывают практическую осуществимость изобретения на основе приведенного выше описания.

Пример 1. Идентификация белков, связывающихся с FOLR1.

Построение библиотек и клонирование библиотек.

Библиотеки, содержащие рандомизированные положения аминокислот, были синтезированы на месте с помощью рандомизированных олигонуклеотидов, генерированных синтетическими тринуклеотидными фосфорамидитами (ELLA Biotech), для достижения хорошо сбалансированного распределения аминокислот с одновременным исключением цистеина и других аминокислотных остатков в рандомизированных положениях.

Последовательность убиквитина (SEQ ID NO: 46):

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLS
DYNIQKESTLHLVLRRAA

SEQ ID NO: 46 была рандомизирована в положениях аминокислот 6, 8, 9, 10, 12, 42, 44, 46, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 70, 72. Соответствующая библиотека кДНК была амплифицирована с помощью ПЦР и лигирование с модифицированной фагмидой pCD87SA (называемой здесь pCD12) с использованием стандартных методов, известных специалисту в данной области. Фагмида pCD12 содержит модифицированную лидерную последовательность toG A (делецию аминокислотной последовательности QRAMA) для достижения процессинга белка без дополнительных аминокислот на N-конце. Аликвоты смеси для легирования использовали для электропорации *E. coli* ER2738 (Lucigen). Если не указано иное, использовали известные рекомбинантные генетические методы.

Пример 2. Идентификация белков, связывающихся с FOLR1.

Цель. Последовательность ДНК, кодирующая человеческий FOLR1 (uniprot Accession Number P15328; остатки 25-234), была генетически слита либо с Fc-фрагментом человеческого IgG1, за которым следовала His-метка на С-конце, либо с Avi-меткой, за которой следовала His-метка. -тэгна С-конце. Полноразмерная кДНК с использованием мкдонов человека была предоставлена OriGene Technologies, клонирована в вектор экспрессии млекопитающих pSEP4 и экспрессирована в клетках млекопитающих Expi 293F в различных масштабах от 400 мл до 2 л во встряхиваемых колбах. Экспрессионные культуры с конструкцией pSEP4-FOLR1-Avi-His дополнительно котрансфицировали pSEP4-BirA для индукции сайт-направленного биотинилирования целевого белка. Экспрессионные культуры анализировали с помощью SDS-PAGE и иммуноблот-анализа с антителами, направленными против FOLR1, Fc-части человеческого IgG1 или биотина.

Супернатант клеточной культуры экспрессии FOLR1-Fc-His центрифугировали и фильтровали для нанесения на аффинную хроматографию на колонке HisTrap excel объемом 1 мл (GE Healthcare). Целевой белок элюировали путем инъекции буфера, содержащего имидазол, и наносили на колонку для гель-фильтрации Superdex 200 XK 16/600. Супернатант клеточной культуры экспрессии FOLR1-Avi-His центрифугировали, фильтровали и обессоливали для нанесения на аффинную хроматографию на Streptavidin Mutein Matrix (Roche). Целевой белок элюировали путем инъекции биотин содержащего буфера и наносили на колонку для гель-фильтрации Superdex 200 10/300. Чистоту выделенного целевого белка анализировали и подтверждали с помощью SDS-PAGE и SE-HPLC. Биологическая активность целевого белка в отношении фолиевой кислоты субстрата была подтверждена зависимым от концентрации ELISA.

Первичный выбор с помощью фагового дисплея TAT. Наивную библиотеку обогатили по FOLR1 с использованием фагового дисплея в качестве системы отбора. После трансформации компетентных бактериальных клеток ER2738 (Lucigene) фагмидой pCD12, несущей библиотеку, проводили амплификацию и очистку фага с использованием стандартных методов, известных специалисту в данной области. Для отбора целевой белок иммобилизовали на магнитных шариках. Таким образом, целевой белок, слитый с IgG1-Fc, иммобилизовали на Protein A или Protein G Dynabeads®. Сайт-направленный биотинилированный целевой белок, слитый с Avi-меткой, или целевой белок, слитый с IgG1-Fc, который дополнительно произвольно биотинилировали, иммобилизовали на Streptavidin или Neutravidin SpeedBeads™. Концентрация FOLR1 во время инкубации фага была снижена с 200 нМ (первый цикл) до 100 нМ (второй цикл), до 50 нМ (третий цикл) и 25 нМ (четвертый цикл). При первом отборе был проведен предварительный отбор с использованием биотинилированного Fc-фрагмента IgG1, начиная со второго цикла. При втором отборе проводили предварительную инкубацию частиц фага с сывороткой мыши в течение последних трех циклов в течение 3 часов во втором цикле и 23 часа в третьем и четвертом цикле, соответственно, а также предварительный отбор с биотинилированным Fc-фрагментом IgG1. Комплексы фага FOLR1 отделяли от супернатанта с помощью магнитов и промывали несколько раз. Связанные с FOLR1 фаги элюировали трипсином. Для идентификации пулов фагов, специфичных для мишеней, элюированные и повторно амплифицированные фаги каждого цикла отбора анализировали с помощью ELISA пула фагов. Лунки микротитровального планшета со средним связыванием (Greiner Bio-One) покрывали FOLR1 (2, 5 мкг/мл). Связанные фаги детектировали с использованием антитела, конъюгированного с α -M13 HRP (GE Healthcare).

Клонирование пулов связывающих мишень фагов в вектор экспрессии. Селекционные пулы, показывающие специфическое связывание с FOLR1 в фаговом пуле ИФА, амплифицировали с помощью ПЦР в соответствии с методами, известными в данной области, разрезали соответствующими рестрикционными нуклеазами и лигировали с производным вектора экспрессии pET-28a (Merck, Германия), содержащим Strep-Tag II (IBA GmbH).

Анализ попаданий в одну колонию. После трансформации клеток BL21 (DE3) (Merck, Германия) выращивали устойчивые к канамицину единичные колонии. Экспрессия Белок, связывающих FOLR1, достигалась культивированием в 384-луночных планшетах (Greiner Bio-One) с использованием среды для автоиндукции (Studier, 2005, Protein Expr. Purif. 41 (1): 207-234). Клетки собирали и в последствии лизировали

химически или ферментативно с помощью реагента BugBuster (Novagen) и механически с помощью циклов замораживания/оттаивания соответственно. После центрифугирования полученные супернатанты подвергали скринингу с помощью ELISA с иммобилизованной мишенью на микротитрационных планшетах High Bind 384 ELISA (Greiner Bio-One). Обнаружение белка, связанного с FOLR1, было достигнуто с помощью Strep-Tactin® HRP Conjugate (IBA GmbH) в сочетании с TMB-Plus Substrate (Biotrend, Германия). Реакцию останавливали добавлением 0, 2 М раствора H₂SO₄ и измеряли на планшет-ридере при 450 нм по сравнению с 620 нм.

Построение библиотеки созревания. Для созревания выбранных вариантов была проведена подверженная ошибкам ПЦР с использованием dNTP аналога dPTP и 8-охо-dGTP (Jena Bioscience). Полученную кДНК библиотек созревания лигировали с pCD12, как описано выше, и проводили тестовые трансформации в *E. coli* SS320.

Выбор и анализ созревания. Для созревания аффинности было выполнено два цикла панорамирования. Отбор по первому созреванию проводили с произвольно биотинилированным белком-мишенью, слитым с IgG1-Fc, в концентрации 80 нМ и 8 нМ в первом и втором цикле, соответственно. Для обоих циклов была проведена предварительная инкубация фаговых частиц с сывороткой мыши в течение 3 и 23 ч в первом и втором циклах, соответственно, а также предварительный отбор с биотинилированным Fc-фрагментом IgG1. Второй отбор по созреванию проводили с сайт-направленным биотинилированным белком-мишенью, слитым с Avi-меткой в концентрации 50 нМ и 1 нМ в первом и втором цикле, соответственно. Для обоих циклов предварительную инкубацию фаговых частиц с сывороткой мыши проводили в течение 23 часов в первом и втором циклах. Для анализа созревших и отобранных пулов на предмет специфического связывания с мишенью выполняли ELISA фагового пула с последующим клонированием положительных пулов в вектор экспрессии pET-28a и удачным ELISA, как описано выше.

Пример 3. Экспрессия и очистка связывающих FOLR1 белков.

Связывающие белки FOLR1 клонировали в вектор экспрессии с использованием стандартных методов, известных специалисту, очищали и анализировали, как описано ниже. Все специфичные для FOLR1 белки были экспрессированы и подвергнуты высокой очистке с помощью аффинной хроматографии и гель-фильтрации. После очистки аффинной хроматографией была проведена эксклюзионная хроматография (SE HPLC или SEC) с использованием системы Dkta и колонки Superdex™ 200 HiLoad 16/600 (GE Healthcare). Колонка имела объем 120 мл и была уравновешена 2 CV. Образцы наносили

со скоростью потока очищающего буфера 1 мл/мин. Сбор фракций начинался, когда интенсивность сигнала достигала 10 мАЕ. После анализа SDS-PAGE положительные фракции объединяли и измеряли их концентрации белка.

Дальнейший анализ включал SDS-PAGE, SE-HPLC и RP-HPLC. Концентрации белка определяли измерением поглощения при 280 нм с использованием молярного коэффициента поглощения. ОФ-хроматографию (ОФ-ВЭЖХ) выполняли с использованием системы Dionex HPLC и колонки Vydac 214MS54 C4 (4, 6 x 250 мм, 5 мкм, 300 E) (GE Healthcare). Например, Affilin 202521 (SEQ ID NO: 30 с С-концевой связывающей последовательностью «SAC») имеет чистоту около 100% согласно SE-HPLC и RP-HPLC соответственно.

Пример 4. Связывающие белки FOLR1 стабильны при высоких температурах.

Термическую стабильность FOLR1-специфических белков определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Каждый зонд переносили в концентрации 0, 1 мкг/мкл в 384-луночный планшет MicroAmp Optical и добавляли краситель SYPRO Orange при подходящем разбавлении. Изменение температуры от 25 до 95°C было запрограммировано со скоростью нагрева 1°C в минуту (V2A-7 Applied Biosystems). Флуоресценцию постоянно измеряли при длине волны возбуждения 520 нм и длине волны испускания 623 нм (V2A-7, Applied Biosystems). Были определены средние точки перехода для термического разворачивания (T_m , точки плавления), которые показаны в Таблице 3 для выбранных белков, связывающихся с FOLR1.

Таблица 3. Температурная стабильность связывающих белков FOLR1

Affilin	SEQ ID	DSF B °C
197556a	1	80
199490	30	85
199489	31	79
197251	3	80
199484	32	71
199483	33	62
197525	5	82
199487	35	64
199488	34	70
187731	6	87
199477	37	79
199478	36	85
197340	8	72
196920	9	73
196964	12	74
196868	14	79
197383	17	80
196934	18	81
199479	38	65
199480	39	70
199481	40	71
199482	41	72
197126	19	79
199485	43	76
199486	42	72
196888	21	76
181919	26	63
187803	29	62

Пример 5. Анализ связывающих белков FOLR1 (поверхностный плазмонный резонанс, SPR)

Чип сенсора CM5 (GE Healthcare) уравнивали рабочим буфером SPR. Открытые на поверхности карбоксильные группы активировали пропусканием смеси EDC и NHS с получением реакционноспособных сложноэфирных групп. 700-1500 RU FOLR1 (он-лиганд) иммобилизовали на проточной кювете. Проточная ячейка без лиганда использовалась в качестве сравнения. Инъекцию этаноламина после иммобилизации лиганда использовали для блокирования непрореагировавших групп NHS. После связывания лиганд-аналит белка накапливался на поверхности, увеличивая показатель преломления. Это изменение показателя преломления измеряли в реальном времени и отображали как отклик или резонансные единицы (RU) в зависимости от времени. Аналиты наносили на чип последовательными разведениями со скоростью 30 мкл/мин. Ассоциацию проводили в течение 30 секунд, а диссоциацию - 60 секунд. После каждого прогона поверхность чипа регенерировали 30 мкл регенерационного буфера и

уравновешивали текущим буфером. Контрольные образцы наносили на матрицу со скоростью 30 мкл/мин, при этом они связываются в течение 60 секунд и диссоциируют в течение 120 секунд. Регенерация и повторное уравновешивание были выполнены, как упоминалось ранее. Исследования связывания проводили с использованием Biacore 3000 (GE Healthcare); оценка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения BIA evaluation 3. 0, предоставленного производителем, с использованием модели Ленгмюра 1: 1 (RI = 0).

ФИГ. 2, ФИГ. 3 и в Таблице 4 показана аффинность связывания Белок, связывающих FOLR1 с FOLR1-Fc.

Таблица 4. Аффинность связывания (KD) белков, связывающихся с FOLR1, с FOLR1-Fc, как определено с помощью анализа SPR (Biacore).

Affilin	SEQ ID	Biacore B M
197556a	1	4.11E-10
199490	30	1.19E-10
199489	31	2.06E-10
199487	35	1.51E-10
199488	34	8.49E-11
199477	37	1.87E-11
199478	36	2.07E-10
199479	38	4.74E-11
199480	39	3.09E-11
199481	40	3.12E-11
199482	41	2.61E-11
197126	19	2.15E-09
189864	24	2.91E-11
189872	25	4.17E-12
181919	26	1.68E-08
189853	27	7.42E-12
187803	29	3.88E-07

Пример 6. Функциональная характеристика: специфическое связывание с FOLR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, ноне с FOLR2 (проточная цитометрия).

Проточную цитометрию использовали для анализа специфического взаимодействия связывающих белков FOLR1 с FOLR1, экспонируемым на поверхности, ноне с FOLR2. Трансфицированные клетки НЕК293-FOLR1, клетки НЕК293-FOLR2 и пустой вектор контрольных клеток НЕК293-pEntry трипсинизировали и ресуспендировали в среде, содержащей FCS, промывали и окрашивали в предварительно охлажденном блокирующем буфере FACS. Концентрацию клеток 1×10^6 клеток/мл готовили для окрашивания клеток, и 100 мкл/лунку заполняли 96-луночный планшет (Greiner) в трех

экземплярах для каждой клеточной линии. К клеткам со сверхэкспрессией FOLR и контрольным клеткам добавляли 50 нМ белков Affilin или моноклональных антител против FOLR1 человека (клон LK 26; BioLegend, 908301) в качестве положительного контроля или антитела против FOLR2 человека (клон EM35; Sysmex, BD029864). Через 45 минут супернатанты удаляли и добавляли 100 мкл/лунку кроличьих антител к Strep-Tag (GenScript; A00626), разведенных 1: 300 в блокирующем буфере FACS. Антитела против FOLR1 и антитела против FOLR2 детектировали с помощью антител против мышинового IgG-Alexa 488 (Invitrogen; A-10680) с разведением 1: 1000. После удаления первичного антитела применяли козье антитело против кроличьего IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen; A11008) в разведении 1: 1000. Измерение проточной цитометрии проводили на приборе Guava easyCyte 5HT (Merck-Millipore) при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны излучения 520 нм.

Все связывающие FOLR1 белки показали специфическое связывание с клетками, сверхэкспрессирующими HEK293-FOLR1, но не связывались с FOLR1-отрицательными клеточными линиями (например, HEK293-pEntry). Все связывающие FOLR1 белки, протестированные на связывание с FOLR2, не показали связывания с FOLR2. Контроли: анти-FOLR1-антитело в качестве положительного контроля; убиквитин в качестве отрицательного контроля (клетки HEK293-FOLR1).

Пример 7: Мечение гибридного белка DOTA

Белки, связывающие FOLR1, инкубировали с 20-кратным избытком малеимида-DOTA (2, 2', 2'' - (10- (2 - ((2- (2, 5-диоксо-2, 5-дигидро-1H-пиррол -1-ил) этил) амино) -2-оксоэтил) -1, 4, 7, 10-тетраазациклододекан-1, 4, 7-триил) триуксусная кислота, CheMatech) в 50 mM HEPES, 150 mM хлорида натрия, 5 mM ЭДТА pH 7, 0 в течение 3 ч при комнатной температуре. Чтобы уменьшить количество ионов металлов, которые могут взаимодействовать с молекулами DOTA, все колонки и устройства ДКТА (GE Healthcare) инкубировали с 0, 1 M раствором EDTA в течение 30 минут. Для приготовления растворов использовались только безметалловые компоненты или компоненты с пониженным содержанием металлов. После инкубации образцы отделяли от не связавшихся молекул DOTA с помощью гель-фильтрации (Superdex S200, GE Healthcare) в 100 mM ацетате натрия, pH 5, 0-5, 8. Образцы белков также инкубировали с 5 mM хлорида железа (II) в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы доказать доступность DOTA-молекул для связывания с радиоизотопами. После инкубации несвязанное железо удаляли с помощью колонки HiTrap Desalting (GE Healthcare). Для определения степени маркировки использовали анализ MALDI-TOF. В дальнейших

экспериментах белки FOLR1 были связаны с DOTA и помечены Lu3+. Загрузка Lu3+ была при c = 0, 2 мг/мл в 100 нМ Na Acetate при pH 5, 8 с температурами маркировки до 70°C. Молекулы анализировали методом спектроскопии КД при 207 нм.

Пример 8: Матричная лазерная десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия (MALDI-TOF)

Матричную масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) проводили следующим образом: белки, связывающие FOLR1, очищали и концентрировали с использованием наконечников C18-P10-Zip Tips (Millipore; номер по каталогу ZTC18S096). Наконечники промывали 0, 1% (об./об.) Трифтористоводородной кислотой (TFA) в воде и элюировали 50% (об./об.) Ацетонитрилом/0, 1% TFA. Образцы обрабатывали 2% (об./об.) TFA в воде и заливали в матрицу 2, 5-дигидроксиацетофенона (DHAP) (Bruker, номер по каталогу 8231829). Массу белков, связывающихся с FOLR1, измеряли на масс-спектрометре autoflex TM speed (Bruker). Стандарты калибровки белков (Bruker, номер по каталогу 8206355 и номер по каталогу 8207234) использовали для настройки масс-спектрометра autoflex speed.

Белки, связывающие FOLR1 с меткой DOTA и без нее анализировали с помощью масс-спектров MALDI-TOF и сравнивали пики. Анализ MALDI-TOF показал, что молекулы DOTA, меченные белками, связывающимися FOLR1 доступны для связывания с молекулами хлорида железа (II).

Хотя КД немного изменился после мечения белков, связывающихся с FOLR1 мечение не оказало значительного влияния на сродство с белками, связывающимися с FOLR1 с мишенями. Результаты сведены в Таблицу 5 и Таблицу 6.

Пример 9. Стабильность в сыворотке белков, связывающихся с FOLR1 (проточная цитометрия).

Анализировали стабильность белков, связывающихся с FOLR1 в присутствии сыворотки. Связывающие белки инкубировали с серией разведений от 1 мкМ (Affilin-199479, Affilin-199487, Affilin-197556a, Affilin-199488, Affilin-199488-Dota, Affilin-199490 и Affilin-199490-Dota) и 200 нМ (Affilin-199489) в 100% сыворотке мыши в течение 0 ч или в течение 24 ч при 37°C. 100 мкл раствора аффилина в сыворотке использовали для анализа стабильности сыворотки на клетках HEK293-FOLR1 с помощью FACS, как описано выше(пример 6). Анализ FACS подтвердил связывание белков Affilin с FOLR1 даже после 24 ч инкубации в сыворотке мышей (см. Таблицу 5). Были протестированы дополнительные белки FOLR1 (результаты не показаны), и связывание с FOLR1 было

подтверждено даже в присутствии сыворотки.

Таблица 5. Связывание белков, связывающихся с FOLR1 в присутствии сыворотки (проточная цитометрия)

<u>Affilin</u>	<u>EC50 (0h) nM</u>	<u>EC50 (24h) nM</u>	<u>Увеличение (раз)</u>	<u>Стабильность сыворотки</u>
199479	0,34 +/- 0,03	0,31 +/- 0,05	1	Да
199487	0,33 +/- 0,02	0,62 +/- 0,05	1,9	Да
197556a	0,4 +/- 0,04	0,4 +/- 0,06	1,0	Да
199489	0,49 +/- 0,05	0,7 +/- 0,16	1,4	Да
199488	0,44 +/- 0,03	0,65 +/- 0,08	1,5	Да
199488-Dota	0,35 +/- 0,03	0,45 +/- 0,04	1,3	Да
199490	0,43 +/- 0,06	0,47 +/- 0,07	1,1	Да
199490-Dota	0,3 +/- 0,02	0,37 +/- 0,03	1,2	Да

Пример 10. Стабильность в сыворотке белков, связывающихся с FOLR1 (ИФА).

Планшеты с высоким связыванием (Greiner, 781061) иммобилизовали 0,1-2,5 мкг/мл FOLR1-Fc в течение ночи при 4°C. Серии разведений 197556a (SEQ ID NO: 1 с С-концевой последовательностью SAWSHPQFEK), 202521 (SEQ ID NO: 30 с С-концевой связывающей последовательностью «SAC»; см. SEQ ID NO: 44) и 202521-Dota-Lu (SEQ ID NO: 30 с С-концевой связывающей последовательностью «SAC» и Dota, меченный Lutetium Lu³⁺) инкубировали в 100% мышинной сыворотке в течение ночи при 37°C. Планшеты для ELISA промывали 1x PBS и блокировали 3% BSA/0, 5% Tween/PBS в течение 2 часов при комнатной температуре. Серии разведений через 0 или 24 часа инкубации в присутствии сыворотки инкубировали на планшетах для ELISA в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания PBST лунки инкубировали с биотинилированным антителом против убиквитина (1: 1000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Связывание визуализировали с помощью Streptavidin-HRP (1: 10.000). Белки, связывающихся с FOLR1, не показывают сдвига KD после 24 ч инкубации сыворотки. Таким образом, анализ ELISA подтвердил неизменное высокоаффинное связывание белков Affilin с FOLR1 даже после 24 ч инкубации в сыворотке мышей (см. Таблицу 6).

Таблица 6. Связывание белков, связывающихся с FOLR1 в присутствии сыворотки (ИФА)

<u>Affilin</u>	<u>Kd (0h) nM</u>	<u>Kd (24h) nM</u>	<u>Увеличение (раз)</u>	<u>Стабильность сыворотки</u>
197556a	0,035 +/- 0,001	0,041 +/- 0,004	1,2	Да
202521	0,074 +/- 0,003	0,11 +/- 0,003	1,5	Да
202521-Dota-Lu	0,050 +/- 0,002	0,046 +/- 0,003	0,9	Да

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, связывающийся с рецептором фолиевой кислоты альфа (FOLR1), имеющий аминокислотную последовательность, идентичность последовательности которой составляет от 70% до 83% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46, где аминокислоты, соответствующие положениям 9, 10, 12, 42, 44, 46, 62, 63, 64, 65, 66, 68 и 70 из SEQ ID NO: 46 заменены следующим образом:

положение 9 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, L, S или N и

положение 10 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, Q, Y или I, и

положение 12 SEQ ID NO: 46 выбирается из Y, E, W или D и

положение 42 SEQ ID NO: 46 выбирается из E, K, Y, Q или M и

положение 44 SEQ ID NO: 46 выбирается из L, Y, V или F и

положение 46 SEQ ID NO: 46 выбирается из Y, D или S и

положение 62 SEQ ID NO: 46 выбирается из L, R, D или I, и

положение 63 SEQ ID NO: 46 выбирается из G, F, L или A и

положение 64 SEQ ID NO: 46 выбирается из G, D или Y и

положение 65 SEQ ID NO: 46 выбирается из A, D, Y, G или M и

положение 66 SEQ ID NO: 46 выбирается из V, H, Y или T, и

положение 68 SEQ ID NO: 46 выбирается из K, D, P или T и

положение 70 SEQ ID NO: 46 выбирается из Q, P, T, W или H.

2. Белок, связывающийся с FOLR1, по п.1, содержащий аминокислоту с идентичностью последовательности от 75% до 83% с SEQ ID NO: 46.

3. Белок, связывающийся с FOLR1, по п. 1 или 2, отличающийся тем, что аминокислота, соответствующая положению 11 в SEQ ID NO: 46, выбирается из K или R, а аминокислота, соответствующая положению 45 в SEQ ID NO: 46, выбирается из W, R или G.

4. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-3, содержащий аминокислотные остатки

выбранные из EEKY, EERY, EQKY, LYKE, SYKW или NIKD, соответствующих положениям 9, 10, 11 и 12 в SEQ ID NO: 46, и

выбранные из ELLWY, KLLWY, KLLRY, YLYWD, YLYGD, QLVWD или MLFWS, соответствующих положениям 42, 43, 44, 45 и 46 в SEQ ID NO: 46, и

выбранные из LGGAVLKLQ, LGDAVLKLQ, LGGAVLKLKLP, RFGDHLDLT, RFGYHLDLT, DLGGYLPLW или IAYMTLTLH, соответствующих положениям 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70, в SEQ ID NO: 46.

5. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий замены в аминокислотных положениях 1, 2, 3, 4, 5, которые выбираются из положений, соответствующих положениям 6, 8, 13, 14, 20, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 48, 49, 51, 52, 58, 59, 60, 71 и 72 в SEQ ID NO:46, предпочтительно выбранных из любого из K6V, K6Q, L8R, L8E, L8Y, I13T, T14A, T14P, S20C, S20G, I23T, I23V, E24G, E24A, N25D, K29R, K29E, K29T, I30V, I30L, Q31R, D32G, D32N, K33R, K33Q48, E34A, Q49R, E51K, E51D, D52G, D58N, Y59H, N60T, N60S, L71P, R72G, R72Y или R72K.

6. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что белок, связывающийся с FOLR1, представляет собой мультимер, содержащий множество белков, связывающихся с FOLR1 по любому из пп. 1-5, предпочтительно, являющийся димером белка, связывающегося с FOLR1 согласно любому из пп. 1-5, более предпочтительно гомодимер белка, связывающегося с FOLR1 по любому из пп. 1-5.

7. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-6, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 1-45, 69-74, или выбранной из аминокислотных последовательностей, по меньшей мере, на 90% идентичных к ним соответственно.

8. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий один или несколько доменов связывания из 1-80 аминокислот, содержащих один или несколько сайт(ов) связывания для связывания химических групп, где предпочтительно, химические группы выбираются из хелаторов, лекарств, токсинов, красителей и небольших молекул.

9. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий по меньшей мере одну диагностически активную группу, необязательно выбранную из радионуклида, флуоресцентного белка, фотосенсибилизатора, красителя или фермента, или любой комбинации вышеперечисленного.

10. Белок связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий по меньшей мере одну диагностически активную группу, необязательно выбранную из моноклонального антитела или его фрагмента, радионуклида, цитотоксического соединения, цитокина, хемокина, фермента, или их производные, или любая комбинация вышеперечисленного.

11. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащий по меньшей мере одну группу, модулирующую фармакокинетику, необязательно выбранную из полиэтиленгликоля, сывороточного альбумина человека, пептида связывающегося с альбумином, пептида связывающегося с иммуноглобулином или иммуноглобулина или фрагмента иммуноглобулина, полисахарида или неструктурированной аминокислотной последовательности, содержащей аминокислоты аланин, глицин, серин, пролин.

12. Белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-11 для применения в диагностике или лечении опухолей, связанных с FOLR1, предпочтительно для визуализации опухолей, связанных с FOLR1, и лучевой терапии опухолей, связанных с FOLR1.

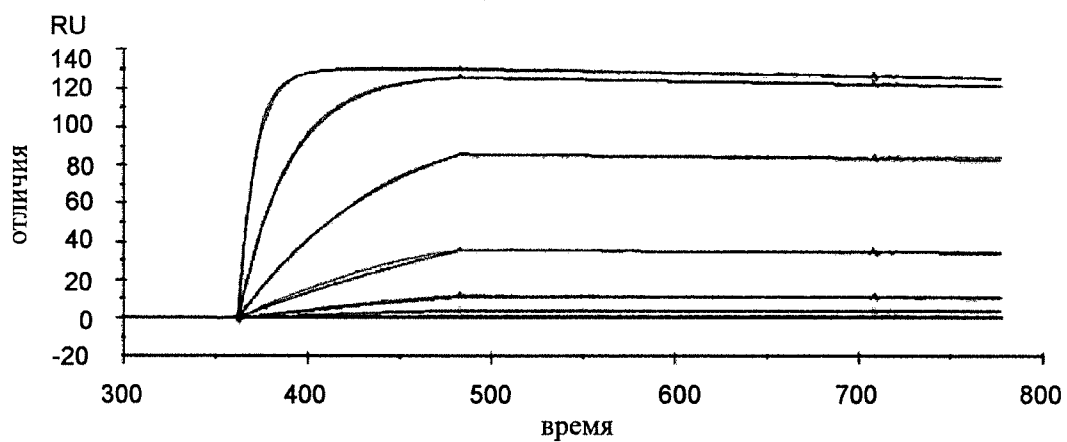
13. Композиция, содержащая белок, связывающийся с FOLR1, по любому из пп. 1-12, для применения в медицине, предпочтительно для применения в диагностике или лечении опухолей, связанных с FOLR1, предпочтительно для визуализации опухолей, связанных с FOLR1, и лучевой терапии опухолей, связанных с FOLR1.

14. Способ получения белка, связывающегося с FOLR1, по любому из пп. 1-13, включающий стадии а) культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для получения указанного белка, связывающегося с FOLR1, и б) выделения указанного продуцируемого белка, связывающегося с FOLR1.

Аминокислотные последовательности белков, связывающихся с рецептором фолиевой кислоты альфа (FOLR1) (серым цветом показаны отличия от SEQ ID NO: 46)

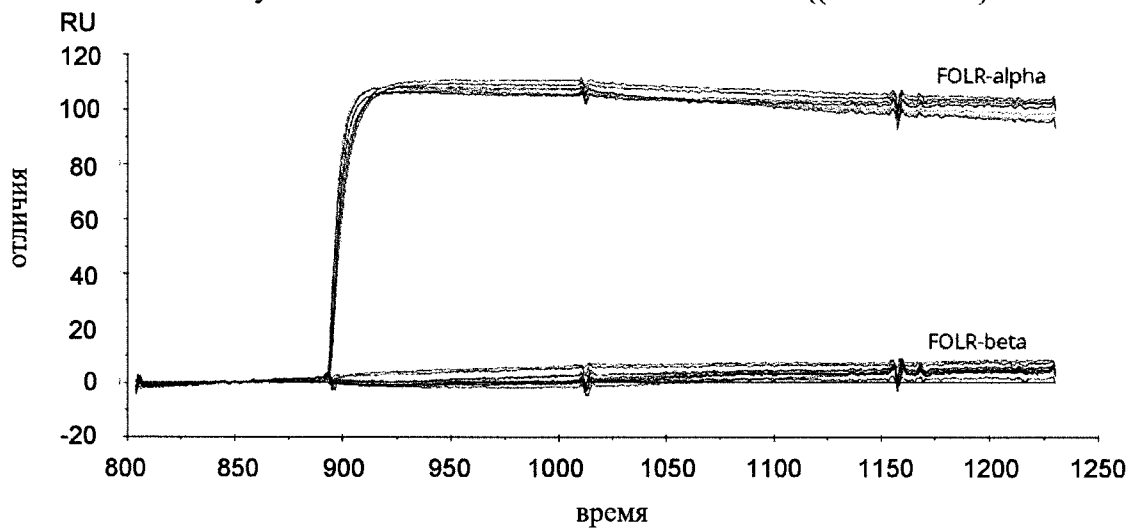
SEQ	Affilin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	
2	197556b	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	V	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	E	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
1	197556a	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	V	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	E	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
3	197251	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	V	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	E	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
5	197525	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	R	V	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
6	187731	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
17	197383	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	N	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	D	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
4	196962	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	R	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
7	197132	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	H	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
10	197103	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	D	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	P	R	L	R	A	A	
69	197103*	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	Q	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	D	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	P	R	L	R	A	A	
11	197032	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	P	R	L	R	A	A	
12	196964	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	T	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
14	196868	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	T	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
18	196934	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	R	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	G	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	D	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
21	196888	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	P	L	R	L	R	A	A	
8	197340	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	R	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	R	L	E	D	G	R	T	L	S	D	N	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A
15	197044	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	E	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	P	R	L	R	A	A	
16	197230	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	E	I	Q	G	R	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
19	197126	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	A	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	P	L	R	L	R	A	A	
20	197014	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	P	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	P	L	R	L	R	A	A	
71	197014*	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	Q	K	Y	I	P	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	P	L	R	L	R	A	A	
9	196920	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	R	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	G	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	E	Q	L	K	D	G	R	T	L	S	D	Y	S	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
13	197312	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	P	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	T	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	D	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
70	197312*	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	Q	K	Y	I	P	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	T	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	D	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
22	197106	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	Q	A	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	P	L	R	L	R	A	A	
23	197252	M	Q	I	F	V	K	T	L	E	E	K	Y	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	R	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	K	L	L	W	Y	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	L	G	G	A	V	L	K	L	Q	L	R	L	R	A	A	
24	189864	M	Q	I	F	V	V	T	R	L	Y	K	E	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	Y	L	Y	W	D	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	R	F	G	D	H	L	D	L	T	L	G	L	R	A	A	
25	189872	M	Q	I	F	V	V	T	R	L	Y	K	E	I	A	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	Y	L	Y	W	D	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	R	F	G	D	H	L	D	L	T	L	G	L	R	A	A	
26</																																																																														

Связывание Affilin-199490 с FOLR1 (FOLR1-альфа)
с альфа высоким средством



ФИГ.2

Отсутствие связывания Affilin-199490 с FOLR2 ((FOLR1-бета)



ФИГ. 3