



(51) МПК
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/475 (2019.02); C07K 19/00 (2019.02); C12N 15/09 (2019.02); C07K 2319/50 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2016128367, 10.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.12.2014

Дата регистрации:
16.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.12.2013 EP 13198738.0

(45) Опубликовано: 16.01.2020 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 20.07.2016

(86) Заявка РСТ:
EP 2014/077196 (10.12.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/091144 (25.06.2015)

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", М.В. Хмара

(72) Автор(ы):

**КОПЕЦКИ Эрхард (DE),
НИВЁНЕР Енс (DE),
МАЙЕР Петер (DE)**

(73) Патентообладатель(и):

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: **LO K. M. et al., High level expression
and secretion of Fc-X fusion proteins in
mammalian cells, Protein engineering, 1998, V.
11, N. 6, p.495-500. WO 2008025527, 06.03.2008.
WO 2009126616, 15.10.2009. KJELDSEN T. et al.,
A removable spacer peptide in an α -factor-leader/
insulin precursor fusion protein improves
processing and concomitant yield of (см. прод.)**

(54) УЛУЧШЕННЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способам получения рекомбинантного полипептида нейротрофина посредством расщепления прополипептида нейротрофина IgA-протеазой, где эндогенный сайт ферментативного расщепления между просегментом и полипептидом нейротрофина

заменен сайтом расщепления IgA-протеазой. Изобретение позволяет высокоэффективно получать активные полипептиды фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофина 3 (NT-3) и нейротрофина 4 (NT-4). 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 22 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*, Gene, 1996, V. 170, N. 1, p.107-112. CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Advanced drug delivery reviews, 2013, V. 65, N. 10, p.1357-1369. ГУЛЬКО Л. Б. и др., Получение полипептидного препарата VNTR22 (MUC1) с потенциальной вакцинирующей противоопухолевой активностью, Биотехнология, 2000, N. 3, с.3-8.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 14/475 (2019.02); C07K 19/00 (2019.02); C12N 15/09 (2019.02); C07K 2319/50 (2019.02)(21)(22) Application: **2016128367, 10.12.2014**(24) Effective date for property rights:
10.12.2014Registration date:
16.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
20.12.2013 EP 13198738.0(45) Date of publication: **16.01.2020** Bull. № 2(85) Commencement of national phase: **20.07.2016**(86) PCT application:
EP 2014/077196 (10.12.2014)(87) PCT publication:
WO 2015/091144 (25.06.2015)

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-
PATENT", M.V. Khmara**

(72) Inventor(s):

**KOPETSKI Erkhart (DE),
NIVENER Ens (DE),
MAJER Peter (DE)**

(73) Proprietor(s):

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)**(54) IMPROVED METHODS OF PRODUCING RECOMBINANT POLYPEPTIDE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to methods of producing a recombinant neurotrophin polypeptide by splitting a neurotrophin pro polypeptide with IgA protease, where the endogenous enzymatic cleavage site between the prosegment and the neurotrophin polypeptide is replaced

with the IgA-protease cleavage site.

EFFECT: invention enables highly effective production of active nerve growth factor (NGF) polypeptides, cerebral neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4 (NT-4).

3 cl, 4 dwg, 22 tbl, 8 ex

C 1
2 7 1 1 3 2 2
R UR U
2 7 1 1 3 2 2
C 1

В данном документе представлены способы, предназначенные, среди прочего, для увеличения выхода биологически активных полипептидов, полученных рекомбинантным способом.

Уровень техники

5 В настоящее время большинство биофармацевтических препаратов производятся в клетках животных (млекопитающих), которые обычно секретируют рекомбинантный полипептид, представляющий интерес, с высокой эффективностью, качеством и соответствующими посттрансляционными (вторичными) модификациями (такими как, например, гликозилирование) в культивационную среду. Тем не менее, некоторые
10 гибридные полипептиды, в особенности сложные гибридные полипептиды, полипептиды с низкой растворимостью или трудностями сворачивания, а также полипептиды, взаимодействующие с клеткой, экспрессирующей их, часто получают с очень низким выходом.

Например, антитела, как правило, экспрессируются в клетках млекопитающих с
15 высокой эффективностью в биологически активной форме. Тем не менее, гибридные полипептиды, содержащие антитело, например, конъюгаты антител с зеленым флуоресцентным белком (GFP), совсем не экспрессируются и/или не секретируются, хотя такие белки были бы весьма интересны для экспериментальных и диагностических подходов (см., например, WO 2011/135040).

20 В некоторых случаях трудно экспрессируемые полипептиды могут быть получены в виде растворимых секретируемых неактивных белков-предшественников, например, так называемых зимогенов в случае протеаз, которые впоследствии могут подвергаться созреванию *in vitro*, например, путем протеолитической активации. В других случаях полипептиды, которые являются вредными для конкретной клетки-хозяина, могут быть
25 экспрессированы в виде неактивных нерастворимых белковых агрегатов в клетке (телец включения (*inclusion bodies*, IB)), а потом подвергнуты рефолдингу *in vitro*. Тем не менее, процессинг прополипептидов может быть трудным или вообще невозможным. Кроме того, полученные зрелые полипептиды не содержат все посттрансляционные модификации.

30 Примерами слабо экспрессируемых полипептидов являются нейротрофические факторы, такие как NGF, BDNF, GDNF и NT-3 (см., например, Xia, Ch.-F., J. Gene Med. 10 (2008) 306-315; Boado, R.J., Pharm. Res. 24 (2007) 1772-1787; Negro, A., et al., J. Neurochem. 62 (1994) 471-478).

В публикации WO 2008/005847 сообщается о способе получения белков фактора VIII
35 с помощью рекомбинантных методик. Удлиненные белком гликозилированные полипептиды описаны в WO 02/02597. В WO 2007/044323 сообщается о гибридных белках для доставки через гематоэнцефалический барьер. Модуляторы роста нервных клеток (амфитела) описаны в WO 00/64482. В WO 2012/087835 представлены композиции и способы улучшения сворачивания белков. Стабильные и растворимые антитела,
40 ингибирующие TNF-альфа, описаны в WO 2006/131013. В WO 00/23473 сообщается о гибридных белках интерферона бета и их применении.

Сущность изобретения

В данном документе представлены способы улучшения процесса получения рекомбинантно продуцируемого полипептида.

45 Улучшение может представлять собой, например, повышенный выход, более надежный процесс получения, более простой процесс и/или уменьшение сложности последующей обработки.

Нужно указать, что улучшение достигается без ухудшения биофизических и/или

биохимических свойств и/или биологических функций полипептида. В некоторых случаях одно или более чем одно из этих свойств даже улучшено.

Первый аспект, описанный в данном документе, заключается в том, что было обнаружено, что путем введения одного или более чем одного сайта гликозилирования может быть улучшена рекомбинантная продукция полипептида в клетке млекопитающего.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного полипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид, где аминокислотная последовательность полипептида была модифицирована с помощью i) одной или более чем одной мутации поверхностно расположенных аминокислотных остатков, что приводит к более низкой изоэлектрической точке вариантного полипептида по сравнению с данным полипептидом, и/или ii) линкерного пептида, соединяющего два полипептида гибридного полипептида, и/или iii) N- или C-концевой слитой метки, содержащей аминокислоты, приводящие к более низкой изоэлектрической точке полипептида,

- извлечение рекомбинантного вариантного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Таким образом, в данном документе описан способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного полипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование эукариотической клетки (в одном из воплощений клетки млекопитающего), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид, где аминокислотная последовательность полипептида была модифицирована так, чтобы включать один или более чем один искусственный сайт гликозилирования,

- извлечение вариантного рекомбинантного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного полипептида, включающий следующие этапы:

- получение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид,
- модификация нуклеиновой кислоты, чтобы она кодировала вариантный полипептид,

где аминокислотная последовательность полипептида была модифицирована так, чтобы включать один или более чем один искусственный сайт гликозилирования,

- введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку (в одном из воплощений в клетку млекопитающего),

- культивирование эукариотической клетки, и

- извлечение вариантного рекомбинантного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Способы, описанные в данном документе, особенно подходят, например, для полипептидов, которые слабо или вовсе не экспрессируются/секретируются в клетках млекопитающих.

Введенный сайт (сайты) гликозилирования может быть расположен (расположены независимо от других) либо в самом полипептиде, либо в линкерном пептиде, соединяющем два полипептида гибридного полипептида, либо он может быть специфической меткой гликозилирования.

В одном воплощении полипептид содержит метку гликозилирования.

В одном воплощении полипептид содержит искусственный сайт гликозилирования. В одном воплощении искусственный сайт гликозилирования вводится путем точечной мутации поверхностно расположенной аминокислоты.

5 Второй аспект, описанный в данном документе, заключается в том, что было обнаружено, что если заменить в прополипептиде эндогенный сайт расщепления протеазой между просегментом и зрелым полипептидом на экзогенный (относительно происхождения полипептида) или искусственный сайт расщепления протеазой, то выход зрелого полипептида может быть повышен. Это изменение улучшает процессинг
10 прополипептида в зрелую форму.

Таким образом, один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного прополипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование эукариотической клетки (в одном из воплощений клетки
15 млекопитающего), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид в виде прополипептида (гибридного полипептида просегмента и полипептида), в котором эндогенный сайт ферментативного расщепления между просегментом и полипептидом заменяется экзогенным сайтом расщепления протеазой,
- извлечение рекомбинантного вариантного полипептида или вариантного
20 прополипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного прополипептида, включающий следующие этапы:

- 25 - получение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид в виде прополипептида (гибридного полипептида из просегмента и полипептида),
- модификация нуклеиновой кислоты, чтобы она кодировала вариантный прополипептид, в котором эндогенный сайт ферментативного расщепления между просегментом и полипептидом заменяется экзогенным сайтом расщепления протеазой,
- 30 - введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку (в одном из воплощений в клетку млекопитающего),
- культивирование эукариотической клетки, и
- извлечение рекомбинантного вариантного полипептида или вариантного прополипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение
35 рекомбинантного полипептида.

В одном воплощении экзогенный сайт расщепления протеазой выбирают из группы, содержащей сайт расщепления плазмином, сайт расщепления фурином, сайт расщепления IgA-протеазой, сайт расщепления протеазой TEV (от англ. tobacco etch virus - вируса табачной мозаики), сайт расщепления гранзимом В, сайт расщепления тромбином, сайт
40 расщепления фактором 10, сайт расщепления энтерокиназой, сайт расщепления субтилизином, сайт расщепления катепсином, сайт расщепления металлопротеиназой, сайт расщепления протеазой IDES (от англ. IgG-degrading enzyme of Streptococcus pyogenes - фермент Streptococcus pyogenes, расщепляющий IgG), сайт расщепления протеазой PreScission или их функциональные варианты. В одном воплощении экзогенный сайт
45 расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления IgA-протеазой.

В одном воплощении расщепление прополипептида осуществляется в среде культивирования. В одном воплощении экзогенную протеазу, способную к расщеплению экзогенного сайта расщепления протеазой, добавляют в среду культивирования. В

одном воплощении добавление происходит на этапе культивирования. В одном воплощении добавление происходит после этапа культивирования.

В одном воплощении экзогенную протеазу экспрессировали совместно из клетки, экспрессирующей прополипептид.

5 В одном воплощении культивирование является совместным культивированием клетки, экспрессирующей прополипептид, и клетки, экспрессирующей экзогенную протеазу.

10 В одном воплощении расщепление осуществляется после отделения клеток от среды культивирования. В одном воплощении расщепление происходит во время последующей обработки. В одном воплощении расщепление осуществляется на хроматографической колонке.

Третий аспект, описанный в данном документе, заключается в том, что было обнаружено, что с понижением изоэлектрической точки полипептида рекомбинантная продукция полипептида в клетке млекопитающего может быть повышена.

15 Таким образом, один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного полипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование эукариотической клетки (в одном из воплощений клетки млекопитающего), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид, в котором аминокислотная последовательность полипептида была изменена с помощью одной или более чем одной мутации поверхностно расположенных аминокислотных остатков, что давало более низкую изоэлектрическую точку вариантного полипептида по сравнению с полипептидом,

20 - извлечение рекомбинантного вариантного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида с использованием вариантного полипептида, включающий следующие этапы:

- получение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид,

30 - модификация нуклеиновой кислоты, чтобы она кодировала вариантный полипептид, в котором аминокислотная последовательность полипептида была изменена с помощью одной или более чем одной мутации поверхностно расположенных аминокислотных остатков, что давало более низкую изоэлектрическую точку вариантного полипептида по сравнению с данным полипептидом,

35 - введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку (в одном из воплощений в клетку млекопитающего),

- культивирование эукариотической клетки, и

- извлечение рекомбинантного вариантного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

40 В одном воплощении полипептид имеет изоэлектрическую точку выше 9 (высокая изоэлектрическая точка, основная изоэлектрическая точка), а вариантный полипептид имеет изоэлектрическую точку, которая на 0,5 или более единиц рН ниже (более кислая) по сравнению с (родительским/дикого типа) полипептидом.

В одном воплощении полипептид представляет собой нейтрофин/нейротрофический фактор.

В одном воплощении изоэлектрическая точка понижается за счет введения отрицательно заряженной группировки.

В одном воплощении отрицательно заряженная группировка представляет собой

линкерный пептид.

В одном воплощении отрицательно заряженная группировка представляет собой остаток поверхностно расположенный аминокислотный остаток. В другом воплощении один или более чем один аминокислотный остаток основного характера заменен нейтральным гидрофильным аминокислотным остатком и/или аминокислотным остатком кислотного характера или их комбинацией.

Четвертый аспект, описанный в данном документе, заключается в том, что было обнаружено, что путем корректировки длины и соединения линкерного пептида можно улучшить рекомбинантную продукцию гибридного полипептида в эукариотической клетке, такой как, например, клетка млекопитающего.

Таким образом, один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения (рекомбинантного) гибридного полипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование эукариотической клетки (в одном из воплощений клетки млекопитающего), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный полипептид,
- извлечение (рекомбинантного) гибридного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение (рекомбинантного) гибридного полипептида.

В одном воплощении одна часть гибридного полипептида представляет собой нейротрофин, а другая часть гибридного полипептида представляет собой антитело или фрагмент антитела.

Пятый аспект, описанный в данном документе, заключается в том, что было обнаружено, что

- i) путем введения одного или более чем одного сайта гликозилирования, и/или
- ii) путем замены в прополипептиде эндогенного сайта расщепления протеазой между просегментом и полипептидом на экзогенный сайт (относительно происхождения частей гибридного полипептида) или искусственный сайт расщепления протеазой, и/или
- iii) путем понижения изоэлектрической точки полипептида, и/или
- iv) путем корректировки длины, соединения и заряда линкерного пептида можно улучшить рекомбинантную продукцию полипептида в клетке млекопитающего.

Таким образом, один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения (рекомбинантного) (гибридного) полипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование эукариотической клетки (в одном из воплощений клетки млекопитающего), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный (гибридный) полипептид, где аминокислотная последовательность (гибридного) полипептида была изменена
- i) путем введения одного или более чем одного искусственного сайта гликозилирования, и/или
- ii) путем замены в про(гибридном)полипептиде эндогенного сайта расщепления протеазой между просегментом и (гибридным) полипептидом на экзогенный сайт (относительно происхождения частей гибридного полипептида) или искусственный сайт расщепления протеазой, и/или
- iii) путем понижения изоэлектрической точки (гибридного) полипептида, и/или
- iv) путем корректировки длины линкерного пептида, корректировки соединения линкера, корректировки заряда линкера, введения одной или более чем одной мутации

поверхностно расположенных аминокислотных остатков, дающих более низкую изоэлектрическую точку (гибридного) полипептида,

- извлечение (гибридного) полипептида или (гибридного) прополипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение (рекомбинантного) (гибридного) полипептида.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения (рекомбинантного) гибридного полипептида, включающий следующие этапы:

- получение нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид,

- модификация нуклеиновой кислоты, чтобы она кодировала вариантный гибридный полипептид, в котором аминокислотная последовательность гибридного полипептида была изменена путем корректировки длины линкерного пептида, корректировки соединения линкера, корректировки заряда линкера, введения одной или более чем одной мутации поверхностно расположенных аминокислотных остатков, дающих более низкую изоэлектрическую точку гибридного полипептида,

- введение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку (в одном из воплощений в клетку млекопитающего),

- культивирование эукариотической клетки, и

- извлечение (рекомбинантного) вариантного гибридного полипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение (рекомбинантного) гибридного полипептида.

В одном из воплощений предыдущих аспектов гибридный полипептид содержит биологически активную группу, линкерный пептид и одновалентную связывающую группу, которая связывается с рецептором гематоэнцефалического барьера (от англ. blood-brain-barrier, BBB).

В одном из воплощений рецептор гематоэнцефалического барьера выбран из группы, включающей рецептор трансферрина, рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста, белок, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности (LRP) /рецептор альфа-2-макроглобулина, белок 8, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности (также известный как рецептор 2 аполипопротеина E (ApoER2)), белок 1, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности (также известный как рецептор альфа-2-макроглобулина (A2MR)), и гепарин-связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста.

В одном из воплощений линкерный пептид содержит один или более чем один отрицательно заряженный аминокислотный остаток. В одном из воплощений линкерный пептид содержит два или более двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков. В одном из воплощений линкерный пептид содержит два, или три, или четыре, или пять отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

В одном из воплощений биологически активная группа представляет собой нейротрофический фактор. В одном из воплощений нейротрофический фактор представляет собой нейротрофический фактор головного мозга (brain derived neurotrophic factor, BDNF).

В одном из воплощений одновалентная связывающая группа связывается с рецептором гематоэнцефалического барьера и представляет собой одновалентный фрагмент антитела, предпочтительно, выбранный среди scFv, Fv, scFab, Fab, VHH.

В одном из воплощений гибридный полипептид представляет собой одноцепочечный гибридный полипептид, содержащий в качестве первой части человеческий нейротрофический фактор головного мозга, а в качестве второй части отдельный Fab-

или scFv-фрагмент антитела против рецептора трансферрина, которые конъюгированы друг с другом либо напрямую, либо через линкерный пептид.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой гибридный полипептид, включающий

- 5 - ровно один полипептид нейротрофического фактора дикого типа, или вариантный полипептид нейротрофического фактора, или его фрагмент с активностью нейротрофического фактора,
- связывающий домен, и
 - линкерный пептид между полипептидом нейротрофического фактора и фрагментом
- 10 антитела.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой гибридный полипептид с активностью нейротрофического фактора (например, димерный комплекс), включающий

- 15 - ровно один тип полипептида нейротрофического фактора дикого типа, или вариантного полипептида нейротрофического фактора, или его фрагмента с активностью нейротрофического фактора,
- связывающий домен, и
 - линкерный пептид между полипептидом нейротрофического фактора и фрагментом
- антитела.

- 20 В одном из воплощений связывающий домен представляет собой сайт связывания фрагмента антитела. В одном из воплощений связывающий домен представляет собой фрагмент антитела, содержащий сайт связывания антитела. В одном из воплощений фрагмент антитела специфически связывается с рецептором гематоэнцефалического барьера. В одном из воплощений фрагмент антитела представляет собой
- 25 фрагмент антитела, выбранный из группы, включающей scFv, Fv, scFab, Fab, V_HN.

- В одном из воплощений рецептор гематоэнцефалического барьера выбран из группы, включающей рецептор трансферрина, рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста, белок, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности (LRP) /рецептор альфа-2-макроглобулина, белок 8, связанный с рецептором липопротеина
- 30 низкой плотности (также известный как рецептор 2 аполипопротеина E (ApoER2)), белок 1, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности (также известный как рецептор альфа-2-макроглобулина (A2MR)), и гепарин-связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста.

- В одном из воплощений гибридный полипептид содержит вторую одновалентную
- 35 или двухвалентную связывающую группу, которая не связывается с рецептором BBB.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой комплекс, содержащий

- в качестве первого компонента гибридный полипептид, описанный в данном документе, и
- 40 - в качестве второго компонента полипептид нейротрофического фактора дикого типа, или вариантный полипептид нейротрофического фактора, или его фрагмент с активностью нейротрофического фактора.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой многомерный комплекс с активностью нейротрофического фактора, включающий

- 45 - в качестве первого компонента гибридный полипептид, описанный в данном документе, и
- в качестве второго компонента полипептид нейротрофического фактора дикого типа, или вариантный полипептид нейротрофического фактора, или его фрагмент с

активностью нейротрофического фактора.

В одном из воплощений указанный комплекс представляет собой димерный комплекс.

В одном из воплощений всех аспектов нейротрофический фактор выбран среди фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротрофина 3 (NT-3) и нейротрофина 4 (NT-4). В одном предпочтительном воплощении нейротрофический фактор роста представляет собой BDNF.

Все аминокислотные последовательности, представленные в данном документе, являются конкретными аспектами данного изобретения.

10 Подробное описание изобретения

Причина (причины) низкого экспрессионного выхода рекомбинантно полученных полипептидов в клетках млекопитающих часто не известна и, как правило, трудно определима.

Некоторые полипептиды могут мешать функциям клетки-хозяина при экспрессии. Это может быть, например, неправильная сортировка в неправильное клеточное местоположение или экспрессия в неправильном пространственном (например, тип клеток) и/или временном (например, при зависимости от клеточного цикла) контексте. Кроме того, увеличение рекомбинантной экспрессии и секреции полипептидов может привести к неблагоприятным условиям сворачивания белка, например, приводящим к агрегации белка и/или клеточным стрессовым реакциям. В заключение, рекомбинантная экспрессия полипептидов может быть затрудненной (например, давая низкий экспрессионный выход) или даже невозможной в конкретной клетке-хозяине.

Способы, приведенные в данном документе, являются иллюстративными в отношении конкретных полипептидов, гибридных полипептидов и полипептидов, слитых с антителами. Эти молекулы используются только в качестве примера и не должны быть истолкованы как ограничивающие объем данного изобретения.

Нейротрофические белки вызывают высокий терапевтический интерес. Например, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) предлагается использовать для лечения или облегчения симптомов болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и перинатальной болезни белого вещества, болезни Дауна и аутизма/синдрома Ретта, шизофрении, депрессии, нарушения пищевого поведения, бокового амиотрофического склероза, рассеянного склероза, нервных повреждений, например, спинного мозга, а также других заболеваний (Apfel, S.C., Clin. Chem. Lab Med. 39 (2001) 351-355; Nagahara, A.H. and Tuszynski, M.H., Nat. Rev. Drug Discov. 10 (2011) 209-219; Zuccato, C. and Cattaneo, E., Nature Reviews Neurology 5 (2009) 311-322; Thoenen, H. and Sendtner, M., Nature Neuroscience Supplement 5 (2002) 1046-1050; Gharami, K., et al., J. Neurochem. 105 (2008) 369-379).

В человеческом организме нейротрофические белки находятся на очень низком уровне и часто экспрессируются специализированными типами клеток, расположенными в очень сложной среде (см., например, Greenberg, M.E., et al., J. Neurosci. 29 (2009) 12764-12767). В соответствии с их природными функциями уровни экспрессии нейротрофинов в эукариотических клетках, обычно используемых для рекомбинантной промышленной продукции таких полипептидов (например, клетках CHO, клетках COS, клетках NSO и клетках НЕК), являются очень низкими (Acklin, C. et al., Int. J. Pept. Protein Res. 41 (1993) 548-552).

I. Повышение экспрессии путем введения сайтов N-гликозилирования

Одним из аспектов, описанных в данном документе, является введение одного или более чем одного (искусственного) сайта гликозилирования в полипептид для его

рекомбинантной продукции. Путем ведения одного или более чем одного (искусственного) сайта гликозилирования может быть улучшена рекомбинантная продукция полипептида в эукариотической клетке, особенно в клетке млекопитающего. Этот способ особенно подходит, например, для полипептидов, которые слабо или совсем не экспрессируются/секретируются в клетках млекопитающих. Введенный сайт гликозилирования может находиться либо в самом полипептиде, либо в линкерном пептиде, соединяющем два полипептида гибридного полипептида, либо он может быть меткой специфического гликозилирования. Особенно предпочтительно введение сайта гликозилирования путем точечной мутации поверхностно локализованной аминокислоты для создания (искусственного) мотива N-гликозилирования.

Пример: Гибридные полипептиды, содержащие часть антитела и GFP

Были сконструированы иллюстративные гибридные полипептиды, содержащие антитело и группировку GFP

GlySer-линкер (GGGSGGGGSG; SEQ ID NO 01) был использован для слияния либо i) группировки eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок, последовательность SEQ ID NO 02), либо ii) группировки emGFP (зеленый флуоресцентный белок Emerald; SEQ ID NO 03), либо iii) группировки tagGFP (SEQ ID NO 04) с С-концами тяжелых цепей (HC) анти-IGF-1R-антитела подкласса IgG1 (HC: SEQ ID NO 05; LC: SEQ ID NO 06). Различные гибриды тяжелой цепи имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO 07, 08 и 09.

Секреция гибридных полипептидов-антител не могла быть выявлена во всех клеточных культуральных супернатантах временно трансфицированных HEK293-клеток с использованием вестерн-блота и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на основе белка А. Также биологически активный GFP нельзя было контролировать за счет его биолюминесцентных свойств (GFP-специфическая флуоресценция). Но гибридные полипептиды могли быть обнаружены во фракции клеточного осадка путем вестерн-блота. Результаты приведены в следующей таблице.

Таблица 1

Молекула GFP	Секретированный гибридный белок [мкг/мл]
eGFP	менее 1
emGFP	менее 1
tagGFP	менее 1

менее 1 мкг/мл - ниже предела обнаружения

Без привязки к этой теории GFP является цитоплазматическим мономерным белком с тенденцией к формированию (слабых) димеров. Таким образом, GFP дикого типа "от природы" (природная клетка медузы *Aequorea Victoria*) не предназначен для секреции, и, следовательно, молекула GFP должна быть сделана подходящей для секреции из-за несовместимости с системой секреции клеток млекопитающих.

Для того чтобы получить секретлируемые GFP-содержащие гибридные полипептиды, в гибридный полипептид также был включен полипептид, полученный из человеческого светочувствительного мембраносвязанного рецептора опсина, связанного с G-белком, найденного в фоторецепторных клетках сетчатки, например, в качестве метки гликозилирования. С помощью этой метки гликозилирования в гибридный полипептид вводят дополнительные (искусственные) сайты N-гликозилирования.

Полипептид, полученный из рецептора опсина, был слит непосредственно, т.е. без промежуточного линкерного пептида, с С-концом GFP-группировки. Полипептид,

полученный из опсина (NGTEGPNFYVPPFSNATGVV; опсин-метка, SEQ ID NO 10), содержит два мотива сайта N-гликозилирования: мотив NGT и мотив NAT (обычный мотив сайта N-гликозилирования: N×S/T; Asn с последующей любой аминокислотой, за исключением Pro, а затем Ser или Thr). Временная экспрессия гибридных полипептидов, содержащих опсиновую метку гликозилирования (SEQ ID NO 11), в клетках HEK293 приводит к секреции гибридного полипептида. Результаты приведены в следующей таблице.

Таблица 2

Молекула GFP	Опсиновая метка	Секретированный гибридный белок [мкг/мл]
eGFP	нет	менее 1
eGFP	есть	15

менее 1 мкг/мл - ниже предела обнаружения

Из SDS-PAGE-анализа (размывание полос) можно видеть, что секретируемые гибридные полипептиды содержат дополнительные углеводы.

Гибридные полипептиды "антитело-GFP-опсиновая метка" очищали путем двухэтапной процедуры, в частности, аффинной хроматографии на белке А с последующей эксклюзионной хроматографией. Функциональность группировки антитела в гибридном полипептиде была продемонстрирована путем связывания с рецепторным белком IGF-1R с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) и интернализации в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза в клетках, сверхэкспрессирующих IGF-1R, с помощью FACS и/или конфокальной микроскопии. Функциональность GFP-группировки была показана благодаря ее характеристикам зеленой флуоресценции.

Пример: Нейротрофические белки

Иллюстративным нейротрофическим белком является нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).

i) Метка гликозилирования

Человеческий пре-про-BDNF дикого типа, содержащий С-концевую T7 His6-метку (MASMTGGQMG-NNNNN, используется для аффинной очистки; SEQ ID NO 12), слитую через GSG-линкер, экспрессируют в клетках HEK239 (пре-про-BDNF-T7-His6; SEQ ID NO 13). Аминокислотная последовательность зрелого BDNF не содержит мотив N-гликозилирования и, следовательно, не является N-гликозилированным. Зрелый BDNF получают с низким выходом, который составляет лишь несколько мкг/мл. Низкий выход экспрессии гена не может быть улучшен путем оптимизации кодонов гена, или путем удаления потенциальных сайтов расщепления протеазой (пре-про-BDNF(-RGR)-T7-His6), или путем замены нативной сигнальной последовательности BDNF сигнальной последовательностью хорошо экспрессируемого антитела (MGWSCILFL VATATGVHS; SEQ ID NO 14), или путем замены препросегмента BDNF таковым из NGF. Результаты приведены в следующей таблице (значения нормированы по концентрации зрелого BDNF).

Таблица 3

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка для очистки	Нормированный секретированный гибридный полипептид [мкг/мл]
пре-про-BDNF	нет	GSG	нет	3-5
пре-про-BDNF	да	GSG	нет	3-5
пре-про-BDNF (кодон-оптимизированная)	да	GSG	T7-His6	2,5-5
пре-про-BDNF (сигнальная последовательность антитела)	нет	GSG	T7-His6	3
пре-про-BDNF (пре-про из NGF)	нет	GSG	T7-His6	0,5

Для того чтобы улучшить (секреторный) выход BDNF, в молекулу BDNF были введены (искусственные) сайты гликозилирования с использованием опсиновых меток гликозилирования различной длины: 16 аминокислотных остатков (NGTEGPNFYVPFSNAT; SEQ ID NO 15), 19 аминокислотных остатков (NGTEGPNFYVPFSNATGVV; SEQ ID NO 10) и 20 аминокислотных остатков (NGTEGPNFYVPFSNATGVVR; SEQ ID NO 16). С помощью этой модификации экспрессионный выход (нормированный по концентрации зрелого BDNF) может быть улучшен. Результаты приведены в следующей таблице (нормированы по концентрации зрелого BDNF).

Таблица 4

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка гликозилирования SEQ ID NO:	Линкерный пептид	Метка очистки	Нормированный секретированный гибридный полипептид [мкг/мл]
пре-про-BDNF	нет	GSG	нет	нет	T7-His6	от 3 до 5
пре-про-BDNF	да	GSG	нет	нет	T7-His6	от 3 до 5
пре-про-BDNF (кодон-оптимизированная)	да	GSG	нет	нет	T7-His6	от 2,5 до 5
пре-про-BDNF (сигнальная последовательность антитела)	нет	GSG	нет	нет	T7-His6	3
пре-про-BDNF (пре-про из NGF)	нет	GSG	нет	нет	T7-His6	0,5
пре-про-BDNF	да	GSG	15	GS G	T7-His6	более 22*
пре-про-BDNF	да	GSG	15	GS G	His6	более 22*
пре-про-BDNF	да	GSG	16	нет	His6	более 22*

*: превышен линейный диапазон количественной оценки

Неожиданно варианты BDNF, содержащие метку гликозилирования, также имели улучшенную биологическую активность по сравнению с нативным негликозилированным BDNF (CHO-TgkB-люциферазный анализ с репортерным геном). Результаты приведены в следующей таблице.

Таблица 5

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка гликозилирования SEQ ID NO:	Линкерный пептид	Метка очистки	Активность BDNF в TgkB-люциферазном анализе, EC50 [нМ]
пре-про-BDNF	да	GSG	нет	нет	T7-His6	3,4
пре-про-BDNF	да	GSG	15	GSG	T7-His6	0,3
пре-про-BDNF	да	GSG	15	GSG	His6	0,3
пре-про-BDNF	да	GSG	16	нет	His6	0,3

Другими возможными сайтами гликозилирования являются AAANGTGGGA (один мотив сайта N-гликозилирования; SEQ ID NO 17), ANITVNIIV (два мотива сайта N-

гликозилирования; SEQ ID NO 18) и NATGADNGTGAS (два мотива сайта N-гликозилирования; SEQ ID NO 19).

ii) Введенный мотив(ы) сайта N-гликозилирования

Для того чтобы улучшить (секреторный) выход BDNF, в аминокислотную последовательность BDNF были введены искусственные сайты N-гликозилирования. Искусственный сайт N-гликозилирования может быть введен, например, путем точечной мутации в аминокислотной последовательности BDNF (мотив сайта N-гликозилирования: Asn-Xxx-Ser/Thr; Xxx является любой аминокислотой кроме Pro). Соответствующие кодирующие нуклеиновокислотные последовательности были получены и временно экспрессированы в клетках HEK293. Нумерация мутаций основана на аминокислотной последовательности зрелого BDNF (SEQ ID NO 25). Для секретированных вариантов BDNF анализировали уровень экспрессии/секреции, степень N-гликозилирования (выведенную из миграции полосы из-за увеличения MW примерно на 3-5 кДа на каждый введенный и имеющийся сайт N-гликозилирования (по сравнению с негликозилированным референсом BDNF) в анализе иммуноблоттинга) и функциональность/связывание рецептора с помощью анализа с репортерным геном CHO-TrkB-люциферазы. Результаты представлены в следующих таблицах (экспрессионный выход и биологические активности, нормированные по концентрации зрелого BDNF) и на фиг. 3.

Таблица 6

Молекула BDNF	Удаление RGR на C-конце	Линкерный пептид	Метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Нормированный секретированный гибридный полипептид [мкг/мл]	Активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [нМ]	Степень гликозилирования	Дорожка на фиг. 3
пре-про-BDNF	да	GS G	T7- His6	нет	6	3,4	-	2
пре-про-BDNF	да	GS G	T7- His6	M61T	8,3	n.d.	-	3
пре-про-BDNF	да	GS G	T7- His6	Q79S	9,6	6,9	-	4
пре-про-BDNF	да	GS G	T7- His6	R81N	12,5	0,8	++	5

n.d.: не определено

-: нет гликозилирования

+: частичное гликозилирование

++: полное гликозилирование

Таблица 7

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Нормированный секретированный гибридный полипептид	Активность BDNF в ТгВ-люциферазном анализе	Степень гликозилирования
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	нет	1,7		

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Нормированный секретированный гибридный полипептид	Активность BDNF в TgkB-люциферазном анализе	Степень гликозилирования
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	W19N	n.d.	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N	6,9	активный	++
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	D30N	n.d.	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	G33N	7,4	неактивный	++
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	T35N	14,9	активный	++
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	P43N	n.d.	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	P43N, V42G	n.d.	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	M61S, P60G	2,2	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	G62N, Y63G	8,8	активный	++
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	Q79T	8,4	активный	+
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	W76N	2,6	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	M92N	n.d.	n.d.	-
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	D106N	1,4	n.d.	-

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Нормированный секретированный гибридный полипептид	Активность BDNF в ТгВ-люциферазном анализе	Степень гликозилирования
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	T112N	2,6	неактивный	+

n.d.: не определено

нет: нет гликозилирования

+: частичное гликозилирование

++: полное гликозилирование

Активный: BDNF-активность в сравнении с активностью негликозилированного зрелого BDNF дикого типа, экспрессированного в *E.coli*, подвергнутого рефолдингу и очищенного

Неактивный: никакой активности не выявлено

Функциональность/биологическая активность гликозилированных вариантов BDNF также была показана в анализе дорсальных корешковых ганглиев (dorsal root ganglion DRG). Активность, определенная в анализе DRG, была сравнима с негликозилированным BDNF дикого типа.

II. Повышение экспрессии путем модификации сайтов ферментативного расщепления

Часто секретируемые полипептиды синтезируются в виде препрополипептидов.

Пресегмент представляет собой так называемую сигнальную последовательность.

Просегмент может быть, например, необходим для сворачивания белка, клеточного нацеливания/транспортировки в конкретный клеточный компартмент (например, в лизосомы) или инактивации зрелого белка во время транспортировки и хранения в клетке или внеклеточной транспортировки (например, секреции в культуральную среду).

Пре- и просегменты не являются необходимыми для биологической активности зрелого полипептида. Если просегмент не процессируется правильно, т.е. (пре-)просегмент не отщепляется от зрелого белка, например, в продуцирующей/секретирующей клетке, то он может изменять биофизические, биохимические и/или биологические активности зрелого полипептида.

Способ, представленный ниже, подходит для полипептидов, которые производятся *in vivo* из прополипептида путем ферментативного расщепления.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения рекомбинантного полипептида из прополипептида с использованием вариантного прополипептида, включающий следующие этапы:

- культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую прополипептид (гибридный полипептид из просегмента и полипептида), в котором эндогенный сайт ферментативного расщепления между просегментом и полипептидом заменяется экзогенным сайтом расщепления протеазой,

- извлечение рекомбинантного вариантного прополипептида из клетки или культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой способ получения гибридного полипептида из гибридного прополипептида, включающий следующие этапы:

- 5 - культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный гибридный прополипептид, в котором аминокислотная последовательность гибридного прополипептида была модифицирована путем замены в нативном гибридном прополипептиде эндогенного сайт расщепления протеазой между просегментом и гибридным полипептидом на экзогенный (относительно происхождения частей гибридного полипептида) или искусственный сайт расщепления протеазой,
- 10 - извлечение гибридного прополипептида из клетки или культивационной среды, отщепление гибридного прополипептида и, таким образом, получение (рекомбинантного) гибридного полипептида.

В одном из аспектов, описанных в данном документе, сайт расщепления протеазой между просегментом и зрелым полипептидом в прополипептиде заменяется экзогенным (относительно происхождения полипептида или частей гибридного полипептида) или искусственным сайтом расщепления протеазой.

Термин "эндогенный сайт расщепления протеазой», используемый в данном контексте, обозначает сайт расщепления протеазой, который в природе находится между просегментом и зрелым полипептидом.

Термин "экзогенный сайт расщепления протеазой», используемый в данном контексте, обозначает сайт расщепления протеазой, который в природе не обнаружен между просегментом и зрелым полипептидом.

При замене эндогенного сайта расщепления протеазой экзогенным сайтом расщепления протеазой процессинг и расщепление секретируемого прополипептида в его зрелой форме могут быть улучшены.

Экзогенный сайт расщепления протеазой может быть получен из любой протеазы, пока протеаза не присутствует/экспрессируется в клетке, из которой получен прополипептид, т.е. в которой прополипептид встречается в природе (частично или полностью).

Экзогенный сайт расщепления протеазой (по отношению к происхождению полипептида) может представлять собой любой экзогенный сайт расщепления протеазой, такой как, например, сайт расщепления IgA-протеазой, сайт расщепления протеазой TEV (от англ. tobacco etch virus - вирус табачной мозаики), сайт расщепления гранзимом В, сайт расщепления тромбином, сайт расщепления фактором 10, сайт расщепления энтерокиназой, сайт расщепления субтилизином, сайт расщепления катепсином, сайт расщепления металлопротеиназой, сайт расщепления протеазой IDES (от англ. IgG-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* - фермент *Streptococcus pyogenes*, расщепляющий IgG), сайт расщепления протеазой PreScission или их функциональные варианты.

Расщепление прополипептида может происходить в различные моменты времени во время рекомбинантной продукции полипептида.

Расщепление прополипептида может происходить в культивационной среде. При этом экзогенную протеазу (обеспечивающую расщепление прополипептида) добавляют в культивационную среду, либо экзогенная протеаза (обеспечивающая расщепление прополипептида) коэкспрессируется в культивационной среде.

Кроме того, можно расщеплять прополипептид после его выделения из клеток, например, до, во время или после последующей обработки (но после культивирования).

В одном предпочтительном воплощении экзогенный сайт расщепления протеазой

получен из другого организма, отличающегося от источника прополипептида и от рекомбинантной клетки, экспрессирующей этот прополипептид. Преимущество этого заключается в том, что можно определить точку процессинга прополипептида. Если клетка, экспрессирующая вариантный прополипептид, не коэкспрессирует экзогенную протеазу, и экзогенная протеаза не добавляется в культивационную среду, то расщепление уже не может быть осуществлено клеткой, экспрессирующей вариантный прополипептид, или во время культивирования, соответственно.

В одном воплощении расщепление прополипептида осуществляют во время очистки.

В одном воплощении расщепление прополипептида осуществляют на колонке во время процесса очистки. В одном конкретном воплощении колонна представляет собой аффинную колонку.

В одном предпочтительном воплощении расщепление прополипептида осуществляют путем инкубирования прополипептида с протеазой после того, как прополипептид был отделен от культивационной среды. В одном воплощении инкубацию осуществляют после первого этапа (хроматографической) очистки. В одном воплощении инкубацию осуществляют на колонке.

Эта методика также позволяет, например, включать в просегмент искусственную метку очистки, такую как, например, His6-метка, тус-метка, НА-метка или биотин/авидин-метка, для улучшения/упрощения очистки.

В одном воплощении прополипептид содержит просегмент и зрелый полипептид, где просегмент содержит метку очистки. В одном воплощении метка очистки выбрана из группы меток очистки, включающей His6-метку, тус-метку, НА-метку и биотин/авидин-метку.

В одном воплощении расщепление прополипептида, включающего метку очистки, осуществляют после этапа очистки с использованием метки очистки.

В любом случае отщепление просегмента от зрелого полипептида осуществляют перед введением зрелого полипептида пациенту. В одном воплощении расщепление осуществляют *in vitro*.

В одном предпочтительном воплощении эндогенный сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления IgA-протеазой, а метка очистки представляет собой гексагистидиновую (His6) метку. В одном воплощении гексагистидиновую метку конъюгируют через пептид GSG с сайтом расщепления протеазой.

Пример: пре-про-BDNF-вариант с экзогенным сайтом расщепления протеазой в прополипептиде BDNF

Примером полипептида, который экспрессируется в виде (пре)прополипептида и расщепляется в зрелую форму, является BDNF.

Человеческий BDNF дикого типа экспрессировали в клетках HEK293. Во время процессинга полипептида (т.е. во время экспрессии/рекомбинантной продукции) просегмент только частично удалялся под действием протеаз клетки-хозяина, что приводило к образованию смеси зрелого BDNF и непроцессированного про-BDNF. Человеческий про-BDNF процессировался во время секреции в клетке-хозяине, главным образом, с помощью фурина, секреторной конвертазы пробелков.

Был сконструирован про-BDNF-вариант, в котором природный сайт расщепления протеазы фурина был заменен экзогенным сайтом расщепления IgA-протеазой. IgA-протеаза распознает и расщепляет белки, содержащие аминокислотную последовательность N-X-Z-Pro-Pro/-Y-Pro-C (X - предпочтительно Pro или Ser; Y - Thr, Ser или Ala; Z - предпочтительно Arg или Thr). Аминокислотная последовательность про-BDNF-полипептида содержит сайт расщепления фурина (RVRR; SEQ ID NO 21).

Сайт расщепления фурина был заменен сайтом расщепления IgA-протеазой (GSVVAPPAP; SEQ ID NO 22). Кроме того, через линкерный пептид GSG с С-концом BDNF был слит His6-сайт (НННННН, используется для аффинной очистки; SEQ ID NO 23). Также был удален потенциальный сайт расщепления протеазой (удаление С-концевой аминокислотной последовательности RGR; SEQ ID NO 24). В сравнительных вариантах мутация R54A была введена в прополипептид BDNF (пре-про-BDNF-полипептид имеет в аминокислотной позиции 54 аминокислотный остаток Ala вместо Arg), и/или вместо His6-метки использовали T7-His6-метку. Результаты приведены в следующей таблице (биологическая активность нормирована по концентрации зрелого BDNF).

Таблица 8

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	Метка очистки	Мутация в пре-про-BDNF	Сайт расщепления протеазой	Нормированный секретированный гибридный полипептид	Активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [нМ]
пре-про-	да	GS	T7-His6	нет	фурин	6	3,4
BDNF		G					
пре-про-BDNF	да	GS	His6	R54A	фурин	7,8	1,2
пре-про-BDNF	да	GS	His6	нет	IgA	11	9,6
		G					

Нумерация мутации R54A основана на аминокислотной последовательности пре-про-BDNF дикого типа (SEQ ID NO 20).

Сконструированный пре-про-BDNF-полипептид экспрессировали в клетках HEK293 с высоким выходом. Секретированный сконструированный про-BDNF-полипептид эффективно превращался *in vitro* в зрелый нативный BDNF путем расщепления IgA-протеазой.

Таким образом, в отличие от экспрессии нативного пре-про-BDNF-полипептида, содержащего природный сайт расщепления фурина/конвертазы пропептида, сконструированный про-BDNF полипептид, включающий экзогенный сайт расщепления IgA-протеазой, был получен в виде одного продукта экспрессии. Кроме того, были получены улучшенные экспрессионные выходы. Кроме того, зрелый BDNF-полипептид, полученный из сконструированного про-BDNF-полипептида, обладает повышенной биологической активностью, как зрелый BDNF-полипептид, полученный из пре-про-BDNF дикого типа, в клеточном анализе с репортерным геном люциферазы TrkB.

Пример: пре-про-BDNF-вариант с экзогенным сайтом расщепления протеазой и сконструированной меткой очистки в прополипептиде BDNF

Метки аффинности очень полезны для простой и эффективной очистки рекомбинантно полученных полипептидов. Тем не менее, искусственные метки очистки, которые остаются в конечном терапевтическом белке, неприемлемы для клинического применения по нескольким причинам, в том числе из-за потенциальной иммуногенности, изменений в биофизических и биохимических свойствах, а также биологической

активности. Чтобы преодолеть эти ограничения, полезной является удаляемая метка очистки.

В одном воплощении (BDNF) прополипептид включает метку очистки.

5 Был сконструирован про-BDNF-вариант, в котором в прополипептид введена His6-метка. Кроме того, природный сайт расщепления фурином был заменен экзогенным сайтом расщепления IgA-протеазой, и/или в прополипептид была введена мутация R54A.

В сравнительном варианте His6-метка была слита через линкерный пептид GSG с C-концом BDNF. Кроме того, вместо His6-метки была использована T7-His6-метка.

10 Результаты приведены в следующей таблице (биологическая активность нормирована по концентрации зрелого BDNF) и на фиг. 2.

Таблица 9

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в пре-про-BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка очистки в прополипептиде	Нормированный секретированный гибридный полипептид	Активность BDNF в ТкВ-люциферазном анализе, EC50 [нМ]
пре-про-BDNF	да	GSG	T7-His6	нет	фури н	нет	6	3,4
пре-про-BDNF	да	GSG	His6	R54A	IgA	нет	11,2	9,6
пре-про-BDNF	да	GSG	His6	R54A	фури н	нет	7,8	1,2
пре-про-BDNF	да	нет	нет	R54A	фури н	His6	7,1	1,2
пре-про-BDNF	да	нет	нет	R54A	IgA	His6	8,1	9,6

35 Биологическую активность/функциональность полипептидов BDNF, полученных из различных вариантных про-BDNF-полипептидов, подтверждали в анализах *in vitro* и *in vivo*. Конструкции, содержащие сайт расщепления IgA-протеазой, показали улучшенную активность.

40 Удаляемая метка очистки (например, такая как гекса-гистициновая метка), вставленная в N-концевую область пропептида, может быть использована для эффективного очищения, и будет отщепляется во время созревания белка *in vitro*. Таким образом, никакие потенциально иммуногенные пептидные последовательности не будут сохранены в зрелом полипептиде, который будет использоваться для введения *in vivo*.

45 III. Улучшение экспрессии путем снижения изоэлектрической точки

Некоторые полипептиды, например, нейротрофины, с основной изоэлектрической точкой (IEP), т.е. изоэлектрической точкой выше 9, имеют тенденцию к образованию агрегатов.

В одном из аспектов, описанных в данном документе, снижение изоэлектрической точки полипептида используется для увеличения выхода рекомбинантно продуцируемого полипептида с использованием клеток млекопитающих. Этот способ особенно подходит для полипептидов, имеющих изоэлектрическую точку выше 9 (высокая изоэлектрическая точка, основная изоэлектрическая точка), таких как, например, нейротрофины. Снижение (уменьшение) изоэлектрической точки может быть достигнуто за счет увеличения числа отрицательных зарядов в полипептиде, например, путем введением отрицательно заряженных аминокислотных остатков и/или слияния с отрицательно заряженной группировкой, такой как линкерный пептид. В качестве альтернативы, снижение IEP может быть достигнуто путем удаления положительных зарядов с поверхности полипептида, например, путем введения отрицательно заряженных аминокислотных остатков на поверхность полипептида. Это может быть сделано, например, путем замены одного или более чем одного основного аминокислотного остатка (остатков) остатком нейтральной гидрофильной аминокислоты и/или остатком кислой аминокислоты или их комбинацией.

Пример: варианты BDNF со сниженной изоэлектрической точкой

BDNF имеет изоэлектрическую точку примерно 10 и представляет собой липкую основную/щелочную молекулу (см., например, Leibrock, J., et al., Nature 341 (1989), 149-152).

Для того чтобы улучшить (секреторный) выход, были сконструированы варианты BDNF, в которых аминокислотные остатки были изменены таким образом, чтобы понизить изоэлектрическую точку молекулы. Кроме того, с С-концом BDNF сливали T7-His6-метку через линкерный пептид GSG. Кроме того, в одном сравнительном варианте удаляли потенциальный сайт расщепления протеазой (удаление С-концевой аминокислотной последовательности RGR; SEQ ID NO 23). В первом варианте были введены следующие аминокислотные мутации: R60E, K65D, K73D и K95A. Во втором варианте были введены следующие аминокислотные мутации: K65D, K73D, K95A и R97A. Значения IEP рассчитывали с использованием способа EMBOSS IEP (Alan Bleasby (ajb © ebi.ac.uk); European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK). Результаты приведены в следующей таблице (биологические активности нормированы по концентрации зрелого BDNF).

35

40

45

Таблица 10

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Изоэлектрическая точка	Нормированный секретированный гибридный	Активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, ЕС50 [нМ]
Пре-про-BDNF	нет	GSG	T7-His6	нет	10,8	3-5	3
Пре-про-BDNF	да	GSG	T7-His6	нет	10,6	3-5	3
Пре-про-BDNF	да	GSG	T7-His6	P60E, K65D, K73D, K95A	9,5	8-9	4-5
Пре-про-BDNF	да	GSG	T7-His6	K65D, K73D, K95A, R97A	9,5	8-9	4-5
Пре-про-BDNF	да	GSG	мус-His6	нет	10,1	более 22*	0,36

*: превышен линейный диапазон количественной оценки

В отличие от BDNF дикого типа сконструированные варианты BDNF с пониженной ИЕР стабильно накапливались в течение 3-6 дней в клеточной культуральной среде/ супернатанте во временно трансфицированных клетках HEK293. Это также было показано с помощью исследования культивирования клеток, в котором очищенный зрелый BDNF (полученный в E.coli) и очищенный мус-меченый вариант BDNF со сниженной ИЕР добавляли к растущей культуре клеток-хозяев HEK293 (концентрация BDNF, 10 мкг/мл). После 4 дней культивирования клеток определяли концентрацию оставшегося BDNF в клеточном культуральном супернатанте с помощью анализов SDS PAGE в восстанавливающих условиях и вестерн-блота: зрелый BDNF был полностью выведен из клеточного культурального супернатанта через 4 дня, в то время как мус-меченый вариант BDNF был почти полностью стабильным (см. фиг. 1).

IV. Повышение экспрессии путем сочетания различных модификаций

В одном из аспектов, приведенных в данном документе, для повышения рекомбинантной продукции полипептида была сделана/введена одна или более чем одна из следующих модификаций:

- i) введение одного или более чем одного сайта гликозилирования, и/или
- ii) замена эндогенного сайта расщепления протеазой между просегментом и зрелым полипептидом на экзогенный сайт (относительно происхождения полипептида) или искусственный сайт расщепления протеазой, и/или
- iii) снижение изоэлектрической точки полипептида, и/или
- iv) корректировка длины, соединения и заряда линкерного пептида.

Для дальнейшего повышения рекомбинантной продукции полипептида в некоторых воплощениях используются в комбинации любые две, любые три или все четыре

модификации, описанные выше.

Пример: Нейротрофические белки

Иллюстративный нейротрофический белок представляет собой нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).

5 В аминокислотной последовательности BDNF были сделаны две или более двух из следующих модификаций:

- введение одного или более чем одного искусственного сайта гликозилирования,
- введение опсиновой метки в качестве метки N-гликозилирования, и
- замена эндогенного сайта расщепления фурина экзогенным сайтом расщепления

10 IgA-протеазой.

Результаты представлены в следующих таблицах (биологические активности нормированы по концентрации зрелого BDNF).

Таблица 11

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	метка С-концевая очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Дорожка на фиг. 4
Пре-про-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	A
Пре-про-BDNF	да	GSG	mys-His6	R81N	IgA	16	B
Пре-про-BDNF	да	GSG	mys-His6	R81N	IgA	нет	C
Пре-про-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	D
Пре-про-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	E
Пре-про-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	F

35 На фиг. 4 можно видеть, что экспрессионный/секреторный выход вариантных полипептидов BDNF, содержащих один или более чем один дополнительный сайт N-гликозилирования, улучшается (дорожка A, B и F на фиг. 4) по сравнению с вариантами BDNF без дополнительного N-гликозилирования (дорожка C, D и E на фиг. 4).

40

45

Таблица 12

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования	SEQ ID NO	Нормированный секретированный гибридный полипептид [мкг/мл]	Активность BDNF в ТгкВ-люциферазном анализе, EC50 [% или нМ]
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	нет	фурин	нет	6	100%	
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	нет	IgA	нет	11	282%	
пре-про-BDNF	да	GS G	нет	R81N	IgA	нет			
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	R81N	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	мус- His6	R81N	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	мус- His6	R81N	IgA	нет			
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	нет	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	K25N	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	T35N	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	K25N, T35N	IgA	16			
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, T35N, R81N	IgA	нет			

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Нормированный секретированный полипептид [мкг/мл]	гибридный	Активность BDNF в ТгкВ-люциферазном EC50 [% или нМ]	анализе,
пре-про- BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, T35N, Q79T, R81N	IgA	нет				
пре-про- BDNF	да	GS G	His6	G62N, Y63G,	IgA	16				
пре-про- BDNF	да	GS G	His6	G62N, Y63G, K25N, T35N	IgA	16				
BDNF дикого типа (E.coli)									0,44	
пре-про- BDNF	да	GS G	T7-His6	G62N, Y63G, Q79T	фурин	нет			0,13	
пре-про- BDNF	да	GS G	T7-His6	T35N, Q79T	фурин	нет			0,064	
пре-про- BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, Q79T	фурин	нет			0,21	
пре-про- BDNF	да	GS G	T7-His6	T35N, G62N, Y63G, Q79T	фурин	нет			0,069	

5

10

15

20

25

30

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования	SEQ_ID NO	Нормированный секретированный гибридный полипептид [мкг/мл]	Активность BDNF в TgkB-люциферазном анализе, EC50 [% или нМ]
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	Q79T, R81N	фурин	нет			0,05
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	T35N, G62N, Y63G	фурин	нет			0,039
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, G62N, Y63G	фурин	нет			276 %
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	G62N, Y63G, R81A	фурин	нет			203 %
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, T35N	фурин	нет			n.d.
пре-про-BDNF	да	GS G	His6	нет	фурин	16			555 %
пре-про-BDNF	да	GS G	T7-His6	K25N, T35N, Q79T	фурин	нет			2828 %

35 V. Повышение экспрессии гибридных полипептидов, транспортирующихся через гематоэнцефалический барьер

Проникновение крупных биотерапевтических препаратов в мозг строго ограничено обширным и непроницаемым гематоэнцефалическим барьером (BBB) совместно с другими клеточными компонентами в нейрососудистом комплексе (neurovascular unit, NVU). Для преодоления этого препятствия были испытаны многие стратегии, и одна 40 из них заключается в использовании путей транцитоза, опосредованных эндогенными рецепторами, экспрессированными в эндотелии капилляров мозга. Против этих рецепторов были сконструированы рекомбинантные белки, такие как моноклональные антитела или полипептиды, для обеспечения рецептор-опосредованной доставки биотерапевтических препаратов в мозг.

45 Биотерапевтические препараты имеют огромный терапевтический потенциал для лечения патологии центральной нервной системы (ЦНС, central nervous system, CNS). Тем не менее, их путь в мозг предотвращается гематоэнцефалическим барьером. Предыдущие исследования продемонстрировали, что очень небольшой процент

(примерно 0,1%) IgG, введенного в кровоток, способен проникать в компартмент ЦНС (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164). Это, безусловно, ограничивает любой фармакологический эффект из-за низкой концентрации биотерапевтического препарата в ЦНС. Таким образом, носители, включающие фрагменты антител, которые

5 опосредуют транспорт в мозг биотерапевтических препаратов, таких как нейротрофические факторы, имеют большое медицинское значение.

Таким образом, были сконструированы гибридные полипептиды, содержащие эффекторную группу и одновалентную или двухвалентную связывающую группу, которая связывается с рецептором BBB (см., например, EP 12182181.3).

10 В одном воплощении одновалентная связывающая группа, специфически связывающаяся с рецептором гематоэнцефалического барьера, или одновалентный фрагмент антитела, специфически связывающийся с рецептором гематоэнцефалического барьера, предпочтительно выбраны среди scFv, Fv, scFab, Fab и VHH.

В одном воплощении эффекторная группа представляет собой нейротрофический

15 полипептид, такой как BDNF.

В одном воплощении рецептор гематоэнцефалического барьера выбран из группы, включающей рецептор трансферрина, рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста, белок 8, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности, белок 1, связанный с рецептором липопротеина низкой плотности, и гепарин-

20 связывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста

Пример: гибридные полипептиды, содержащие часть антитела и BDNF

Boado et al. (Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 1376-1386) сообщают о гибридном полипептиде антитело-BDNF, в котором аминоконцевая часть человеческого BDNF слит с карбоксильным концом тяжелой цепи химерного антитела, распознающим рецептор

25 инсулина человека. Тем не менее, экспрессия этого гибридного полипептида не представляется возможной, поскольку гибридный полипептид агрегирует в клетке.

В целом, BDNF дикого типа или вариант BDNF может быть слит с полипептидной цепью антитела либо через С-конец, либо через N-конец. Поскольку BDNF действует только в виде гомодимера, разработка биологически активных гибридных полипептидов антитело-BDNF требует, чтобы и i) фолдинг, созревание и сборка BDNF-части, и ii)

30 фолдинг и сборка из полипептидных цепей/доменов антитела были правильными. Таким образом, возможны различные форматы (комплексы) гибридных полипептидов, такие как, например, полное антитело, состоящее из двух тяжелых и легких цепей, Fab-

фрагмент антитела, состоящий из легкой цепи и фрагмента тяжелой цепи,

35 одноцепочечный Fab (scFab) или одноцепочечный Fv (scFv) в комбинации с N- или С-концевым слиянием с полипептидом BDNF. Также комплекс гибридного полипептида может содержать две или более двух различных полипептидных цепей, например, комбинацию BDNF-scFv-гибридного полипептида и зрелого (негибридного) BDNF-полипептида, BDNF-Fab(тяжелая цепь)-гибридного полипептида и BDNF-Fab(легкая

40 цепь)-гибридного полипептида или BDNF-Fab(тяжелая цепь)-гибридного полипептида и Fab(легкая цепь)-гибридного полипептида и зрелого (не гибридного)-BDNF-полипептида. Кроме того, полипептид BDNF может быть слит либо непосредственно, либо через линкерный пептид с соответствующей полипептидной цепью антитела.

Линкерные пептиды могут различаться по i) числу аминокислот, ii) виду аминокислот

45 (например, отрицательно заряженных и/или гидрофобных аминокислот), и iii) сконструированным предполагаемым мотивам посттрансляционной модификации (например, мотивам сайтов N-гликозилирования). Например, полипептид BDNF может быть конъюгирован с различными фрагментами антител (например, Fab, scFab и scFv),

соединенными с помощью различных линкерных пептидов, образуя различные биологически активные гибридные полипептиды.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой гибридный полипептид, включающий

- 5 - ровно один полипептид BDNF дикого типа, или вариантный полипептид BDNF, или его фрагмент с активностью BDNF,
- фрагмент антитела, и
 - линкерный пептид между полипептидом BDNF и фрагментом антитела.

Один из аспектов, описанных в данном документе, представляет собой гибридный полипептид с активностью BDNF (например, димерный комплекс), включающий

- 10 - ровно один тип из полипептида BDNF дикого типа, или вариантного полипептида BDNF, или его фрагмента с активностью BDNF,
- фрагмент антитела, и
 - линкерный пептид между полипептидом BDNF и фрагментом антитела.

15 Другой аспект, описанный в данном документе, представляет собой димерный комплекс, содержащий

- в качестве первого компонента гибридный полипептид, описанный в данном документе, и
- в качестве второго компонента полипептид BDNF дикого типа, или вариант полипептида BDNF, или его фрагмент с активностью BDNF.

Было обнаружено, что только гибридные форматы "BDNF-антитело" экспрессируются и должным образом собираются в биологически активной форме в комплексе со вторым негибридным полипептидом BDNF, если формат содержит ровно один полипептид BDNF, ковалентно слитый через линкерный пептид с фрагментом антитела, и ровно

25 один не гибридный полипептид BDNF.

Далее было установлено, что экспрессия таких конструкций может быть дополнительно улучшена с помощью линкерного пептида, содержащего один или более чем один отрицательно заряженный аминокислотный остаток.

Различные форматы гибридного полипептида подвергали временной экспрессии в клетках HEK293. Анализ проводили с использованием вестерн-блота и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на белке А. Результаты приведены в следующей ниже таблице (биологические активности нормированы по концентрации зрелого BDNF).

35

40

45

Таблица 13

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в TrkB ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [%]
wt-BDNF	по	нет	нет	нет	нет	нет	нет	п.а.	п.а.* 100%**	5,7	6%
pp-BDNF	да	GSG	T7-His6	нет	фурин	нет	нет	п.а.	100%	8,9	100%
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	нет	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	нет	нет	п.а.	40%		
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	нет	п.а.	1000%		
pp-BDNF	да	GSG	T7-His6	R81N	фурин	16	нет	п.а.	290%		
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	нет	п.а.	200%	n.d.	10%
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VL(I)	26	менее1%	(0)	n.d.
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	26			

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в TrkB ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VL(I)	27	менее 1%	(0)	n.d.
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	27			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VL(I)	28	3%	(0)	n.d.
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	28			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	26	20%	6.1	28%
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	T7-His6	нет	фурин	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	26	6%	17	n.d.
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	27	5%	13.5	n.d.
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	28	5%	18.5	n.d.
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			

5
10
15
20

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в TrkB ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	нет п.а.	фурин	нет	VH(I) п.а.	29 п.а.	42%	12.4	28%
pp-BDNF	да	GSG	T7- His6	нет	фурин	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	scFv (I)	30	32%	n.d.	3215%
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	нет п.а.	IgA	16 нет	VH(II)) п.а.	29 п.а.	800%	n.d.	200%
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	нет п.а.	IgA	16 нет	VH(II)) п.а.	29 п.а.	900%	n.d.	60%
pp-BDNF	да	GSG	T7- His6	нет	IgA	16	п.а.	п.а.			

25
30
35
40

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в TrkB ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в TrkB-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	нет п.а.	IgA	16 нет	VH(II)) п.а.	29 п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	нет п.а.	IgA	16 нет	VH(II)) п.а.	29 п.а.	900%	n.d.	80%
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF нет LC	да п.а.	GSG	His6 нет	R81N п.а.	IgA	16 нет	VH(II)) п.а.	29 п.а.	1000%	n.d.	Неакт.
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(II)	29	900%	n.d.	110%
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.			

45

5

10

15

20

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в ТгкВ ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в ТгкВ-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	нет	R81N	IgA	16	п.а.	п.а.	380%	п.д.	
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	нет	R81N	IgA	16	п.а.	п.а.	450%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	нет	R81N	IgA	16	п.а.	п.а.	840%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	нет	R81N	IgA	16	п.а.	п.а.	620%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(I)	31			
pp-BDNF	да	GSG	нет	R81N	IgA	16	п.а.	п.а.	560%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	32			

25

30

35

40

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в ТгкВ ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в ТгкВ-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	п.а.	п.а.	520%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	32			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29	160%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(I)	29	460%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	32	200%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29	168%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(I)	31	0%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			

45

5

10

15

20

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в ТкВ ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в ТкВ-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.	1180%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.	630%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.	1110%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	IgA	нет	п.а.	п.а.	870%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	32			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	п.а.	п.а.	790%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			

25

30

35

40

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в ТкВ ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в ТкВ-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	п.а.	п.а.	770%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	16	п.а.	п.а.	1030%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	фурин	нет	VH(I)	32			
pp-BDNF	да	GSG	T7-	нет	фурин	нет	п.а.	п.а.	200%		
нет LC	п.а.	п.а.	His6	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	нет	нет	IgA	16	VH(I)	29			
pp-BDNF	да	GSG	His6	R81N	фурин	нет	п.а.	п.а.	70%		
нет LC	п.а.	п.а.	His6	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	нет	нет	IgA	16	VH(I)	29			

45

Молекула BDNF	Удаление RGR на С-конце	Линкерный пептид	С-концевая метка очистки	Мутация в зрелом BDNF	Сайт расщепления протеазой	Метка гликозилирования SEQ ID NO	Слит с антителом	Слит с антителом с помощью SEQ ID NO	Нормированный относительно секретированного	Активность BDNF в ТГКВ ELISA-анализе, EC50 [нМ]	относительная активность BDNF в ТГКВ-люциферазном анализе, EC50 [%]
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	нет	п.а.	п.а.	70%		
нет LC	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.	нет	п.а.	п.а.			
pp-BDNF	да	GSG	His6	нет	IgA	16	VH(I)	29			

pp-BDNF - пре-про-BDNF

п.а. - не применимо

п.д. - не определено

VL(I) - BDNF, слитый с N-концом варибельного домена легкой цепи анти-IGF-1R-антитела

VH(I) - BDNF, слитый с N-концом варибельного домена тяжелой цепи Fab-фрагмента анти-IGF-1R-антитела

VL(II) - BDNF, слитый с N-концом варибельного домена легкой цепи анти-TfR-антитела (антитело против рецептора трансферрина)

VH(II) - BDNF, слитый с N-концом варибельного домена тяжелой цепи Fab-фрагмента анти-TfR-антитела

нет LC - полипептидная цепь легкой цепи антитела без слитого конъюгата BDNF с используемой тяжелой цепью

scFv - BDNF, слитый с N-концом scFv анти-IGF-1R-антитела

*: коммерческий материал от Peprotech

****:** рекомбинантно полученный в *E. coli*

Описание графических материалов

Фиг. 1 Стабильность BDNF-вариантов во время культивирования клеток. BDNF дикого типа (A), полученный в *E. coli*, и мус-меченый BDNF, полученный путем временной экспрессии в клетках HEK293 (B), добавляли к растущей культуре клеток HEK293 (10 мкг/мл) и определяли концентрацию BDNF в образцах в день 0 и день 4 с помощью анализов SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и вестерн-блота с использованием антитела против BDNF для окрашивания/визуализации; дорожка 1: референсный материал от Peprotech (*E. coli*); дорожка 2: маркер молекулярного веса; вестерн-блот был вырезан и повторно собран для простоты.

Фиг. 2 Анализ SDS-PAGE/вестерн-блот клеточных культуральных супернатантов, содержащих экспрессированные/секретированные варианты полипептиды BDNF; дорожка 1: маркер молекулярного веса; дорожка 2: ряд 1 из таблицы 9; дорожка 3: ряд 5 из таблицы 9; дорожка 4: ряд 2 из таблицы 9; дорожка 5: ряд 4 из таблицы 9; дорожка 6: ряд 3 из таблицы 9; дорожка 7 - референс mBDNF; вестерн-блот был вырезан и повторно собран для простоты.

Фиг. 3 Анализ SDS-PAGE/вестерн-блот клеточных культуральных супернатантов, содержащих экспрессированные/секретированные варианты BDNF-полипептиды; дорожка 1: маркер молекулярного веса; дорожка 2: ряд 1 из таблицы 6 (гликозилированный про-BDNF); дорожка 3: ряд 2 из таблицы 6 (про-BDNF); дорожка 4: ряд 3 из таблицы 6 (гликозилированный зрелый BDNF); дорожка 5: ряд 4 из таблицы 6 (зрелый BDNF).

Фиг. 4 Анализ SDS-PAGE/вестерн-блот клеточных культуральных супернатантов, содержащих экспрессированные/секретированные варианты полипептиды BDNF, указанные в таблице 11; дорожка A: ряд 1 из таблицы 11; дорожка B: ряд 2 из таблицы 11; дорожка C: ряд 3 из таблицы 11; дорожка D: ряд 4 из таблицы 11; дорожка E: ряд 5 из таблицы 11; дорожка F: ряд 6 из таблицы 11; звездочка означает, что были

использованы различные условия экспрессии.

Следующие примеры, последовательности и графические материалы приведены для облегчения понимания данного изобретения, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Понятно, что в процедурах могут быть сделаны модификации без отклонения от сущности данного изобретения.

Примеры

Рекомбинантные методики ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные способы, такие как описанные в Sambrook, J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-биологические реагенты использовали в соответствии с инструкциями изготовителей.

Генный синтез

Нужные гены и сегменты генов получали путем химического синтеза в Geneart GmbH (Регенсбург, Германия). Синтезированные гены и фрагменты генов клонировали в плазмиды для размножения/амплификации в *E.coli*. Последовательность ДНК субклонированных генов и фрагментов генов проверяли путем секвенирования ДНК.

Определение белка

Белковую концентрацию очищенных полипептидов оценивали путем определения оптической плотности (OD) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности полипептида.

Описание основной/стандартной плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих

Нужные гены/полипептиды подвергали экспрессии путем временной трансфекции клеток эмбриональной почки человека (HEK293). Для экспрессии нужного гена/полипептида (например, гибридного полипептида "антитело-GFP", BDNF дикого типа, вариантных полипептидов BDNF, гибридных полипептидов BDNF-Fab и BDNF-scFv) использовали транскрипционную единицу, включающую следующие функциональные элементы:

- немедленный ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса (HCMV), включая интрон А,
- 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина,
- ген, который должен быть экспрессирован, и
- последовательность полиаденилирования из бычьего гормона роста (BGH pA).

Помимо экспрессионной единицы/кассеты, содержащей нужный ген, который должен быть экспрессирован, основная/стандартная плаزمид для экспрессии в клетках млекопитающих содержит

- сайт начала репликации из вектора pUC18, который делает возможной репликацию этой плазмиды в *E.coli*, и
- ген бета-лактамазы, который придает устойчивость к ампициллину в *E.coli*.

Пример 1

Создание плазмид для экспрессии антител

а) Создание плазмид для экспрессии родительского человеческого антитела против человеческого IGF-1R

Сегменты гена, кодирующие переменные области человеческой легкой каппа-цепи (Vk) и тяжелой цепи (VH), присоединяли к сегментам гена, кодирующим константную область человеческой легкой каппа-цепи (Ck) или константную область человеческой тяжелой цепи гамма-1 (CH1-шарнир-CH2-CH3), соответственно. Гены обеих цепей антитела экспрессировали из двух отдельных экспрессионных плазмид, включающих геномную экзон-интронную структуру генов антител. Аминокислотные

последовательности зрелых (без сигнальных последовательностей) тяжелой и легкой цепей антитела против человеческого IGF-1R показаны в SEQ ID NO 05 и SEQ ID NO 06.

Экспрессия цепей антитела контролировалась укороченным (с делецией интрона А) немедленным ранним энхансером и промотором из человеческого цитомегаловируса (HCMV), включая 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) человеческой тяжелой цепи иммуноглобулина, сигнальную последовательность тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH pA). Экспрессионные плазмиды также содержали сайт начала репликации и ген бета-лактамазы из вектора pUC18 для амплификации плазмиды в *Escherichia coli* (см. Kopetzki, E., et al., *Virology* 5 (2008) 56; Ji, C., et al., *J. Biol. Chem.* 284(2009) 5175-5185).

б) Создание плазмиды для экспрессии легкой цепи антитела против рецептора трансферрина

Для того чтобы получить легкую цепь антитела против рецептора трансферрина, химически синтезировали ген легкой цепи, кодирующий сигнальную последовательность тяжелой цепи мышинового иммуноглобулина MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO 14), вариабельный домен VL крысиного антитела против мышинового рецептора трансферрина и константную область человеческой легкой цепи V_κappa. Аминокислотную последовательность VL-домена антитела крысы получали из Boado, R.J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 1251-1258. Аминокислотная последовательность легкой цепи химерного крысиного/человеческого антитела против рецептора трансферрина показана в SEQ ID NO 80.

Пример 2

Создание плазмид для экспрессии гибридного полипептида "антитело - GFP"

а) Создание плазмид для экспрессии гибридных полипептидов "анти-IGF-1R-антитело - GFP"

Все гены, кодирующие гибридные полипептиды "тяжелая цепь человеческого анти-IGF-1R-антитела - GFP", собирали путем слияния химически синтезированного фрагмента ДНК, кодирующего соответствующий вариант GFP, и глицин-серинового линкера, состоящего из двух повторов Gly₄Ser и дополнительного Gly (тяжелая цепь...LSPG-gggsgggsg-GFP), с 3'-концом гена тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела, кодирующего слегка усеченную константную область человеческой тяжелой цепи гамма-1 (удаление последней природной аминокислоты Lys). Аминокислотная последовательность гибридного белка, состоящего из тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела и eGFP, emGFP и tagGFP, показана в SEQ ID NO 07, SEQ ID NO 08 и SEQ ID NO 09, соответственно.

Гены тяжелой и легкой цепи антитела экспрессировали из двух отдельных экспрессионных плазмид, включающих геномную экзон-интронную структуру генов антитела.

б) Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов, состоящих из тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела и eGFP-опсиновой метки

Экспрессионные плазмиды для временной экспрессии в клетках HEK293 гибридных полипептидов, состоящих из тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела и GFP-опсиновой метки, получали из экспрессионных векторов, описанных выше. Они отличаются только в сегменте ДНК, кодирующем GFP-опсиновую метку, где пептид из 19 аминокислот (NGTEGPNFYVVPFSNATGVV; опсин(M); SEQ ID NO 10) сливали непосредственно с C-концом соответствующего GFP. В качестве примера, аминокислотная последовательность гибридного полипептида, состоящего из тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела и eGFP-опсиновой (M) метки, показана в SEQ ID NO 33.

Пример 3

Создание экспрессионных плазмид BDNF

а) Создание экспрессионных плазмид для пре-про-BDNF дикого типа

5 Сегмент ДНК, кодирующий ген пре-про-BDNF человека, получали путем химического синтеза и вставляли в основной экспрессионный вектор, описанный выше. С этой целью ген пре-про-BDNF лигировали с CMV-промотором на его 5'-конце и с последовательностью полиаденилирования бычьего гормона роста на его 3'-конце. Аминокислотная последовательность пре-про-BDNF-белка дикого типа показана в SEQ ID NO 20.

10 б) Создание экспрессионных плазмид для вариантов BDNF

Для того чтобы получить оптимальный выход продукции, было сконструировано несколько вариантов BDNF (см. таблицу ниже):

15 - в некоторых вариантах сигнальная последовательность BDNF дикого типа (пресегмент) была заменена на сигнальную последовательность, полученную из высоко экспрессированной тяжелой цепи мышиноного иммуноглобулина (MGWSCILFLVATATGVHS);

20 - в некоторых вариантах использование кодонов в гене, кодирующем BDNF, было заменено на использование оптимизированных кодонов в просегменте и/или в зрелой части BDNF; гены BDNF с оптимизированными кодонами были получены путем обратной трансляции аминокислотной последовательности с использованием алгоритмов из Geneart (см., например, Fath, S., et al., PLOS One 6 (2011) e17596);

- в некоторых вариантах использовали T7-His6-метку (SEQ ID NO 12), так как она, как правило, увеличивает экспрессию белка (см., например, Luan, C.H., et al., Genome Res. 14 (2004) 2102-2110);

25 - в большинство вариантов BDNF была включена His6-метка для упрощения получения/очистки образца;

30 - в некоторых вариантах последние три С-концевые аминокислоты, RGR-мотив зрелого BDNF, были удалены, так как они могут функционировать как зашифрованный сайт расщепления протеазой для протеаз, таких как фурин, или других конвертаз пробелка;

- в другом варианте сигнальная последовательность и просегмент BDNF были заменены соответствующей аминокислотной последовательностью человеческого NGF, так как было опубликовано, что этот вариант повышает экспрессию другого нейротрофина (Iwane et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 (1994) 225-232).

35

40

45

Таблица 14

Ген/вариант BDNF (описание гена/детали конструкции)	Использование сигнальной последовательности и использование кодонов			метка -1	метк a-2
	пре(BDNF)	про(BDNF)	зрелый (BDNF)		
пре-про-BDNF-T7-His6	BDNF	дикого типа	дикого типа	T7	His6
пре-про-BDNF(-RGR)- T7-His6	BDNF	дикого типа	deltaRGR; 1	T7	His6
пре-про-BDNF(-RGR)- His6, кодон- оптимизирован	BDNF	дикого типа	оптим., deltaRGR	---	His6
пре-про-BDNF(-RGR)- His6, кодон- оптимизирован	BDNF	оптим.	оптим., deltaRGR	---	His6
pre(Ab)-про-BDNF,	антитело; 2	оптим.	оптим.	---	---
пре-про-BDNF(-RGR)- His6, кодон- оптимизирован	BDNF	оптим.	оптим., deltaRGR	---	His6
пре(Ab)-про-BDNF	антитело; 2	оптим.	дикого типа, оптим.	---	His6
пре(NGF)-про(NGF)- BDNF	NGF; 3	дикого типа; NGF; 3	дикого типа, 1	---	His6

1: С-концевой RGR-мотив BDNF удален (deltaRGR)

2: сигнальная последовательность, полученная из высоко экспрессируемой тяжелой цепи иммуноглобулина мышиноного антитела (MGWSCIIIFLVATATGVHS), определенная аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO 14

3: сигнальная последовательность и про-фрагмент BDNF, замененные соответствующей последовательностью из человеческого NGF

с) Создание экспрессионных плазмид для вариантов пре-про(IgA)-BDNF и пре-про(IgA; His6), частично включающих His6-метку с N-конца зрелого BDNF в просегменте

Ген пре-про-(IgA)-BDNF кодирует вариант прополипептида, в котором природный сайт расщепления фурина (RVRR) заменен сконструированным сайтом расщепления IgA-протеазой с последовательностью GSVVAPPAP (см. таблицу ниже).

Кроме того, в некоторых вариантах в прополипептид BDNF вводили точечную мутацию R54A, чтобы удалить предполагаемый сайт расщепления протеазой (см. Mowla, S.J., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 12660-12666). Кроме того, в некоторых вариантах в профрагмент также включали удаляемую His6-метку с N-конца зрелого BDNF. Эта метка упрощает белковую очистку про(IgA; His6)-BDNF-вариантного белка. После окончательного созревания белка *in vitro* с помощью IgA-протеазы про(IgA; His6-фрагмент) удаляли и, таким образом, избегали потенциального риска иммуногенности.

Экспрессионные плазмиды для временной экспрессии пре-про(IgA)-BDNF- и пре-про

(IgA; His6)-BDNF-вариантных генов/белков в клетках HEK293 получали из экспрессионного вектора, описанного выше, который кодирует пре-про-BDNF(-RGR)-T7-His6-белок. Они дифференцируются по следующим характеристикам:

Таблица 15

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Мутация R54A	Сайт расщепления протеазой	His6-метка	SEQ ID NO
пре-про-BDNF(- RGR)-T7-His6	нет	фурин (дикого типа)	С-конец BDNF (-RGR)	35
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)-His6	нет	IgA	С-конец BDNF (-RGR)	43
пре-про(His6-R54A- IgA)-BDNF(-RGR)	есть	IgA	в про(BDNF)	45
пре-про(His6-R54A)- BDNF(-RGR)	есть	фурин (дикого типа)	в про(BDNF)	46
пре-про(R54A)-	есть	фурин	С-конец BDNF	44
BDNF(-RGR)-His6		(дикого типа)	(-RGR)	

Нумерация мутации R54A основана на аминокислотной последовательности пре-про-BDNF дикого типа (SEQ ID NO 20)

d) Создание экспрессионных плазмид для вариантов BDNF со сконструированной изоэлектрической точкой

Ранее были описаны некоторые экспрессированные в *E.coli* и подвергнутые рефолдингу варианты BDNF со сконструированной пониженной ИЕР. Ген пре-про-BDNF (-RGR)-T7-His6 подвергали мутированию соответственно, и полученные мутантные гены BDNF временно экспрессировали в клетках HEK293 (см. таблицу ниже). Кроме того, был сконструирован тус-меченый вариант BDNF, так как (1) тус-метка (EQKLISEEDL; SEQ ID NO 90) вводит изменение заряда примерно -3, и (2) тус-метка имеет человеческое происхождение и, таким образом, должна быть менее иммуногенной.

Таблица 16

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Мутации, используемые для снижения IEP, в зрелом BDNF (deltaRGR)	Источник мутаций BDNF	Метка(и)	Рассчита нная IEP варианта зрелого BDNF (delta RGR)	SEQ ID NO
пре-про-BDNF (-RGR)-T7-His6	нет	BDNF дикого типа	T7, His6	9,58	35
пре-про-BDNF (-RGD; P60E, K65D, K73D, K95A)-T7- His6	P60E, K65D, K73D, K95A	53915428[gb] AAU96862.1]; послед. 10 из US 6723701	T7, His6	8,15	47
пре-про-BDNF (-RGD; K65D, K73D, 95A, R97A)-T7- His6	K65D, K73D, K95A, R97A	mBDNF: 53915427[gb] AAU96861.1] послед. 9 из US 6723701	T7, His6	8,15	48
пре-про-BDNF (-RGD)-myc-His6	нет	BDNF дикого типа	myc, His6	8,83	49

-RGD и (deltaRGR); удаление последних трех С-концевых аминокислот зрелого BDNF; нумерация аминокислотных мутаций начинается с первой аминокислоты зрелого BDNF;

IEP зрелых BDNF(-RGR)-вариантов рассчитывали с использованием статистической программы Pepstats от European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS).

е) Создание экспрессионных плазмид для вариантов BDNF с дополнительными сайтами гликозилирования

Были получены варианты BDNF, которые несут (1) С-концевую метку, содержащую сайты гликозилирования или (2) один сконструированный сайт гликозилирования в пределах зрелой BDNF-группировки.

Метки гликозилирования были выведены из опубликованных последовательностей (например, Meder, D., et al., J. Cell Biol. 168 (2005) 303-313; Bulbarelli, A., et al., J. Cell Sci. 115 (2002) 1689-1702; Perlman, S., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 (2003) 3227-3235; WO 2002/002597), и предположительные сайты N-гликозилирования были предсказаны с помощью искусственной нейронной сети (сервер NetNGlyc; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Для введения сайтов N-гликозилирования в зрелую BDNF-группировку последовательность проверяли на наличие аспарагинов, серинов или треонинов в последовательности зрелого BDNF. Затем на основе трехмерной белковой структуры человеческого BDNF (1bnd; www.rcsb.org) были исключены все не поверхностно расположенные остатки Asn, Ser или Thr. Для остальных поверхностно расположенных остатков Asn, Ser и Thr были идентифицированы смежные аминокислотные остатки,

чтобы сконструировать предполагаемый сайт N-гликозилирования (консенсусный мотив: N-X(S/T), X - любая аминокислота кроме Pro) путем сайт-направленного мутагенеза. Аминокислотные позиции этих предполагаемых сконструированных сайтов N-гликозилирования были использованы для идентификации соответствующих аминокислот в структурно и функционально гомологичных нейротрофинах NGF и NT-3 путем выравнивания последовательностей и сравнения 3D-структур белка. Были исключены те аминокислотные позиции, которые, как ожидается, будут частью поверхности взаимодействия нейротрофин::p75NTR или нейротрофин::Trk(A, B), на основании гомологичных кристаллических структур рецептор:лиганд (например, 3buk, 3ij2 и 2ifg). Отдельные мутации для поверхностно экспонированных предполагаемых сайтов N-гликозилирования вне предполагаемых поверхностей взаимодействия BDNF-TrkB/p75 указаны в приведенной ниже таблице (второй столбец).

Экспрессионные плазмиды для временной экспрессии N-гликозилированных вариантов белков BDNF в клетках HEK293 получены из экспрессионного вектора, кодирующего вариант BDNF пре-про-BDNF(-RGR)-T7-His6 (-RGR: усеченный зрелый BDNF дикого типа, в котором последние три C-концевые аминокислоты RGR были удалены; T7-метка и His6-метка присоединены к усеченному C-концу BDNF через GSG-линкер). Сегменты BDNF, метки, гликолинкеры и мутации, введенные для создания дополнительных искусственных сайтов N-гликозилирования, представлены в следующей таблице.

25

30

35

40

45

Таблица 17

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Мутации в зрелом BDNF (deltaRGR)	Метка гликозили- рования SEQ ID NO	Другие метки	SEQ ID NO (AK- послед.):
исходная конструкция, пре-про-BDNF(-RGR)- T7-His6	нет	нет	T7; His6	35
пре-про-BDNF(-RGR)- опсин(S)-T7-His6;	нет	15	T7; His6	36
пре-про-BDNF(-RGR)- опсин(S)-His6	нет	15	His6	37
пре-про-BDNF(-RGR)- опсин(L)-His6	нет	16	His6	38
пре-про-BDNF(-RGR)- glyco-1	нет	18	His6	39
пре-про-BDNF(-RGR)- glyco-2	нет	17	His6	40
пре-про-BDNF(-RGR)- glyco-3	нет	19	His6	41
пре-про-BDNF(-RGR; M61T)-T7-His6	M61T	нет	T7; His6	42
пре-про-BDNF(-RGR; Q79S)-T7-His6	Q79S	нет	T7; His6	91
пре-про-BDNF(-RGR; R81N)-T7-His6	R81N	нет	T7; His6	89
пре-про-BDNF(-RGR; W19N)-T7-His6	W19N	нет	T7; His6	92
пре-про-BDNF(-RGR; K25N)-T7-His6	K25N	нет	T7; His6	93
пре-про-BDNF(-RGR; D30N)-T7-His6	D30N	нет	T7; His6	94
пре-про-BDNF(-RGR; G33N)-T7-His6	G33N	нет	T7; His6	95

5

10

15

20

25

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Мутации в зрелом BDNF (deltaRGR)	Метка гликозили- рования SEQ ID NO	Другие метки	SEQ ID NO (AK- послед.):
пре-про-BDNF(-RGR; T35N)-T7-His6	T35N	нет	T7; His6	96
пре-про-BDNF(-RGR; P43N)-T7-His6	P43N	нет	T7; His6	97
пре-про-BDNF(-RGR; P43N, V42G)-T7-His6	P43N, V42G	нет	T7; His6	98
пре-про-BDNF(-RGR; M61S, P60G)-T7-His6	M61S, P60G	нет	T7; His6	99
пре-про-BDNF(-RGR; G62N, Y63G)-T7-His6	G62N, Y63G	нет	T7; His6	100
пре-про-BDNF(-RGR; Q79T)-T7-His6	Q79T	нет	T7; His6	101
пре-про-BDNF(-RGR; W76N)-T7-His6	W76N	нет	T7; His6	102
пре-про-BDNF(-RGR; M92N)-T7-His6	M92N	нет	T7; His6	103
пре-про-BDNF(-RGR; D106N)-T7-His6	D106N	нет	T7; His6	104
пре-про-BDNF(-RGR; T112N)-T7-His6	T112N	нет	T7; His6	105

30

SEQ ID NO № для аминокислотных мутаций, введенных путем сайт-направленного мутагенеза в зрелый BDNF (deltaRGR), иллюстративно приведены для BDNF-вариантов пре-про-BDNF(-RGR; M61T)-T7-His6 и пре-про-BDNF(-RGR; R81N)-T7-His6.

f) Создание экспрессионных плазмид для вариантов BDNF, содержащих комбинированные мутации для введения множественных (двух или более) сайтов N-гликозилирования и сайта расщепления IgA

35

40

Для того чтобы создать варианты BDNF с множественными сайтами N-гликозилирования, были объединены некоторые из дополнительных сайтов N-гликозилирования, выявленных в предыдущих экспериментах. Исходная конструкция вариантного полипептида пре-про(IgA)-BDNF(-RGR)-His6 характеризуется сайтом расщепления IgA-протеазой вместо нативного сайта фурина в просегменте, усечением с С-конца зрелого BDNF (удаление последних трех аминокислот RGR) и С-концевой His6-меткой. Желательные мутации и метки были введены/присоединены, как показано в приведенной ниже таблице.

45

Таблица 18

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Дополнительные сайты гликозилирования						мус- метка	SEQ ID NO
	опси н(L)- tag	K25 N	T35N	G62N, Y63G	Q79T	R81N		
Исходная конструкция, пре-про(IgA)- BDNF(-RGR)- His6								43
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; R81N)-опсин(L)	x					x		50
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; R81N)-His6						x		53
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; R81N)-опсин(L)- мус-His6	x					x	x	51
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; R81N)-мус-His6						x	x	52
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR)- опсин(L)-His6	x							54
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; K25N)-опсин(L)- His6	x	x						55
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR;	x		x					56

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Дополнительные сайты гликозилирования						мус- метка	SEQ ID NO
	опси н(L)- tag	K25 N	T35N	G62N, Y63G	Q79T	R81N		
T35N)-опсин(L)- His6								
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; K25N, T35N)- опсин(L)-His6	x	x	x					57
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; K25N, T35N, R81N)-T7-His6		x	x			x		58

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Дополнительные сайты гликозилирования						мус- метка	SEQ ID NO
	опси н(L)- tag	K25 N	T35N	G62N, Y63G	Q79T	R81N		
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; K25N, T35N, Q79T, R81N)-T7- His6			x	x	x	x		59
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; G62N, Y63G)- опсин(L)-His6	x			x				60
пре-про(IgA)- BDNF(-RGR; G62N, Y63G, K25N, T35N)- опсин(L)-His6	x	x	x	x				61

г) Создание экспрессионных плазмид для вариантов BDNF, содержащих комбинированные мутации для введения множественных (двух или более) сайтов N-гликозилирования и сайта расщепления IgA

Для того чтобы создать варианты BDNF с множественными сайтами N-

гликозилирования, были объединены некоторые из дополнительных сайтов N-гликозилирования, выявленных в предыдущих экспериментах. С этой целью в качестве исходного материала использовали вариантный белок пре-про-BDNF(-RGR)-T7-His6, который характеризуется усечением с С-конца зрелого BDNF (удалением последних 5 трех аминокислот RGR) и С-концевой T7-His6-меткой. Желательные мутации были вставлены, как показано в приведенной ниже таблице.

Таблица 19

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Дополнительные сайты гликозилирования					SEQ ID NO (АК- последовательность):
	K25 N	T35 N	G62N, Y63G	Q79T	R81N	
исходная конструкция, пре-про-BDNF(-RGR)- T7-His6						35
пре-про-BDNF(-RGR; G62N, Y63G, Q79T)-T7- His6			x	x		62
пре-про-BDNF(-RGR; T35N, Q79T)-T7-His6		x		x		63
пре-про-BDNF(-RGR; K25N, Q79T)-T7-His6	x			x		64
пре-про-BDNF(-RGR; T35N, G62N, Y63G, Q79T)-T7-His6		x	x	x		65
пре-про-BDNF(-RGR; Q79T, R81N)-T7-His6				x	x	106
пре-про-BDNF(-RGR; T35N; G62N; Y63G)-T7- His6		x	x			66
пре-про-BDNF(-RGR; K25N; G62N; Y63G)-T7- His6	x		x			67
пре-про-BDNF(-RGR; K25N; T35N)-T7-His6	x	x				68
пре-про-BDNF(-RGR; G62N, Y63G, R81N)-T7- His6			x		x	69
пре-про-BDNF(-RGR; K25N; T35N; Q79T)-T7-	x	x		x		70

Вариант BDNF (описание деталей конструкции)	Дополнительные сайты гликозилирования				SEQ ID NO (АК- последователь- ность):
His6					

Пример 4

Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов, состоящих из фрагментов антитела и BDNF

а) Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов, состоящих из BDNF и Fab тяжелой цепи антитела

Для того чтобы получить гибридные полипептиды BDNF-(Gly₄Ser)_n-Fab(тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела), были сконструированы плазмиды для временной экспрессии в клетках HEK293, которые несут химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS (кодирующей ДНК-последовательностью), кодирующей полипептиды со следующими характеристиками:

- пре-про-BDNF-группировка дикого типа с удаленным С-концевым RGR-мотивом слита на С-конце с глицин-богатым линкером с последующей Fab-частью тяжелой цепи (VH-CH1) человеческого анти-IGF-1R-антитела и С-концевой His6-меткой;

- глицин-богатый линкер состоит из мотива (G4S)2-GG, или (G4S)4-GG, или (G4S)6-GG (см. таблицу ниже).

б) Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов, состоящих из BDNF и Fab легкой цепи антитела

Для того чтобы получить гибридные полипептиды BDNF-(Gly₄Ser)_n-Fab, были сконструированы плазмиды для временной экспрессии в клетках HEK293, которые несут химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS, кодирующей полипептиды со следующими характеристиками:

- пре-про-BDNF-группировка дикого типа с удаленным С-концевым RGR-мотивом слита на С-конце с глицин-богатым линкером с последующими Fab-доменами легкой цепи VL-Скарра человеческого анти-IGF-1R-антитела и С-концевой His6-метки;

- глицин-богатый линкер состоит из мотива (G4S)2-GG, или (G4S)4-GG, или (G4S)6-GG (см. таблицу ниже).

Таблица 20

Вариант антитела BDNF (описание деталей конструкции)	Линкер между BDNF и Fab- фрагментом	Fab- фрагмент (анти- IGF-1R MKA)	Метка	SEQ ID NO (AK последовательность):
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)2GG_VL<IGF- 1R>-Ck-His6	(G ₄ S) ₂ -GG	VL- Скаппа	His6	71
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)4GG_VL<IGF- 1R>-Ck-His6	(G ₄ S) ₄ -GG	VL- Скаппа	His6	72
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)6GG_VL<IGF- 1R>-Ck-His6	(G ₄ S) ₆ -GG	VL- Скаппа	His6	73
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)2GG_VH<IGF- 1R>-CH1-His6	(G ₄ S) ₂ -GG	VH-CH1	His6	74
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)4GG_VH<IGF- 1R>-CH1-His6	(G ₄ S) ₄ -GG	VH-CH1	His6	75
пре-про-BDNF(- RGD)_(G4S)6GG_VH<IGF- 1R>-CH1-His6	(G ₄ S) ₆ -GG	VH-CH1	His6	76

с) Создание экспрессионной плазмиды для легкой цепи анти-IGF-1R-антитела
Нативную легкую цепь анти-IGF-1R-антитела использовали для создания BDNF-Fab-
30 комплексов на основе анти-IGF-1R. Создание плазмиды для экспрессии легкой цепи
анти-IGF-1R-антитела описано в примере 1.

d) Создание экспрессионной плазмиды для гибридных полипептидов BDNF-Fab
(тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела), содержащих отрицательно заряженный Gly-Asp-
линкер

35 Для того чтобы получить гибридный полипептид BDNF-(G3D)4-РаВ(тяжелой цепи
анти-IGF-1R-антитела), конструировали плазмиду для временной экспрессии в клетках
НЕК293, которая скрывала химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS,
кодирующей полипептид со следующими характеристиками:

- пре-про-BDNF-группировка дикого типа с удаленным С-концевым RGR-мотивом
40 слита на С-конце с глицин-богатым отрицательно заряженным линкером с
последующими Fab-доменами тяжелой цепи VH-CH1 человеческого анти-IGF-1R-антитела
и С-концевой His6-меткой;

- глицин-богатый отрицательно заряженный линкер состоит из мотива (G3D)4-GGGS.

е) Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов BDNF-Fab(тяжелой
45 цепи анти-IGF-1R-антитела), несущих сайт расщепления IgA в про-BDNF-сегменте,
отрицательно заряженный GlyAsp-линкер и множественные сайты N-гликозилирования

Для того чтобы получить гибридные полипептиды про(IgA)-BDNF-(G3D)4-Fab
(тяжелой цепи анти-IGF-1R-антитела) с множественными сайтами N-гликозилирования,

конструировали плазмиды для временной экспрессии в клетках НЕК293, которые несли химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS, кодирующей полипептиды со следующими характеристиками:

- пре-про(IgA)-BDNF-группировка с удаленным С-концевым RGR-мотивом зрелого BDNF слита на С-конце с удлиненной опсин-меткой (NGTEGPNFYVPFSNATGVVR; опсин(L); SEQ ID NO 16) с последующими отрицательно заряженным линкером, богатым глицином и аспарагиновой кислотой, и Fab-частью тяжелой цепи (VH-CH1, частично удлинена пептидом EPKSC из шарнира) человеческого моноклонального антитела, направленного против инсулиноподобного фактора роста человека 1 (IGF-1R) и С-концевой His6-метки;

- отрицательно заряженный линкер, богатый глицином и аспарагиновой кислотой, состоит либо из мотива (G3D)4-GGGS, либо из мотива (G2D)5-G2SG.

Детали конструкций приведены в таблице ниже.

Таблица 21

Вариант антитела BDNF (описание деталей конструкции)	His- метка	Сайт расщепле ния протеазой	Введенные дополнительные сайты N- гликозилирования		Линкер между BDNF и Fab- фрагментом	Происхожде ние Fab- фрагмента тяжелой цепи	Пептид EPKSC из шарнира	SEQ ID NO
			опсин- метка	в BDNF(delta RGR)				
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_(G3D)4-G3S_VH<IGF- 1R>-CH1-EPKSC-His6	His6	IgA	нет		(G3D)4-GGGS	<IGF-1R>	да	85
пре-про(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)_опсин(L)-(G3D)4- G3S_VH<IGF-1R>-CH1-His6	His6	IgA	опсин(L)	+R81N	GSG--опсин(L)- (G3D)4-GGGS	<IGF-1R>	по	86
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_(G3D)4-G3S_VH<IGF- 1R>-CH1-His6	His6	IgA	нет		(G3D)4-GGGS	<IGF-1R>	по	84
пре-про(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)_опсин(L)-(G2D)5- G2SG_VH<IGF-1R>-CH1- His6	His6	IgA	опсин(L)	+R81N	GSG-опсин(L)- (G2D)5-G2SG	<IGF-1R>	по	87

е) Создание экспрессионных плазмид для гибридных полипептидов BDNF-Fab(тяжелой цепи антитела против рецептора трансферрина), несущих сайт расщепления IgA в про-BDNF-сегменте, отрицательно заряженный GlyAsp-линкер и множественные сайты N-гликозилирования

Для того чтобы получить гибридные полипептиды про(IgA)-BDNF-(G3D)4-Fab (тяжелой цепи анти-TfR-антитела) с отрицательно заряженным GlyAsp-линкером и множественными сайтами N-гликозилирования, конструировали плазмиды для временной экспрессии в клетках НЕК293, которые несли химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS, кодирующей полипептиды со следующими характеристиками:

- пре-про(IgA)-BDNF-группировка с удаленным С-концевым RGR-мотивом слита на С-конце с опсин(L)-меткой с последующими отрицательно заряженным линкером, богатым глицином и аспарагиновой кислотой, и химерной крысиной/человеческой Fab-частью тяжелой цепью, в которой варибельный домен VH получен из крысиного моноклонального антитела 8D3, которое направлено против мышинового рецептора трансферрина (mTfR), и в которой домен CH1 получен из человеческого IgG1, и С-концевой His6-меткой; аминокислотная последовательность VH-домена антитела

получена из Boado, R.J. et al., Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 1251-1258);

- отрицательно заряженный линкер, богатый глицином и аспарагиновой кислотой, состоит из мотива (G3D)4-GGGS;

5 - в большинстве вариантов эндогенный сайт расщепления фурина/PC конвертазы между просегментом и зрелой частью BDNF заменен на сайт расщепления IgA-протеазой (GSVVAPPAP);

- в некоторых вариантах усеченная зрелая BDNF-группировка дикого типа (BDNF; deltaRGR) заменена на усеченный зрелый вариант BDNF, несущий искусственный сайт гликозилирования R209N (BDNF (deltaRGR; R209N)).

10 Детали конструкций приведены в таблице ниже.

Таблица 22

Вариант антитела BDNF (описание деталей конструкции)	His- метка	Сайт расщепле ния протеазой	Введенные дополнительные сайты N- гликозилирования		Линкер между BDNF и Fab- фрагментом	Происхожден ие Fab- фрагмента тяжелой цепи	Пептид EPKSC из шарни ра	SEQ ID NO (АК- послед овател ьность)
			опсин- метка	BDNF(Δ R GR) группиров ка				
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_(G3D)4- G3S_VH<TfR>8D3-CH1- EPKSC-His6	His6	IgA	нет	нет	(G3D)4- GGGS	<TfR>8D3	да	107
пре-про(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)_опсин(L)-(G3D)4- G3S_VH<TfR>8D3-CH1-His6	His6	IgA	Опсин (L)	R81N	GSG- опсин(L)- (G3D)4- GGGS	<TfR>8D3	нет	81

Вариант антитела BDNF (описание деталей конструкции)	His- метка	Сайт расщепле ния протеазой	Введенные дополнительные сайты N- гликозилирования		Линкер между BDNF и Fab- фрагментом	Происхожден ие Fab- фрагмента тяжелой цепи	Пептид EPKSC из шарни ра	SEQ ID NO (АК- послед овател ьность)
			опсин- метка	BDNF(Δ R GR) группиров ка				
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_(G3D)4- G3S_VH<TfR>8D3-CH1-His6	His6	IgA	нет	нет	(G3D)4- GGGS	<TfR>8D3	по нет	108
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_(G3D)4- G3S_VH<TfR>8D3-CH1	нет	IgA	нет	Нет	(G3D)4- GGGS	<TfR>8D3	нет	109
пре-про(IgA)-BDNF(- RGR)_опсин(L)-(G3D)4- G3S_VH<TfR>8D3-CH1-His6	His6	IgA	Опсин (L)	нет	GSG- опсин(L)- (G3D)4- GGGS	<TfR>8D3	нет	79

Пример 6

е) Создание экспрессионной плазмиды для гибридных полипептидов BDNF-scFv

Для того чтобы получить гибридные полипептиды BDNF(G4S)3-scFv-тяжелая цепь анти-IGF-1R-антитела, конструировали плазмиды для временной экспрессии в клетках НЕК293, которые несли химически синтезированный фрагмент ДНК с CDS, кодирующей полипептид со следующими характеристиками:

- пре-про-BDNF-группировка дикого типа с удаленным С-концевым RGR-мотивом слита на С-конце с (G4S)3-линкером с последующей scFv-группировкой человеческого антитела против человеческого IGF-1R;

- scFv-группировка антитела против человеческого IGF-1R построена из домена VL, за которым следует (G4S)4-GG-линкер, VH-область и His6-метка; аминокислотная последовательность гибридного белка пре-про-BDNF(-RGR)_(G4S)3_scFv-His6<IGF-1R> показана в SEQ ID NO 78.

Пример 7

Временная экспрессия, очистка и аналитическая характеристика полипептидов

Временная экспрессия

Полипептиды были получены путем временной трансфекции клеток НЕК293 (линия, полученная из эмбриональных клеток почки человека 293), культивированных в среде F17 (Invitrogen Corp.). Для трансфекции использовали реагент "293-Free" Transfection Reagent (Novagen). Гибридные полипептиды, содержащие антитело и фрагмент антитела (Fab и scFv), экспрессировали с одной, двух или трех различных плазмид с использованием эквимолярном соотношения плазмиды после трансфекции. Трансфекцию выполняли согласно инструкциям производителя. Клеточные культуральные супернатанты, содержащие рекомбинантный полипептид, собирали в течение 4-7 дней после трансфекции. Супернатанты хранили при пониженной температуре до очистки.

Общая информация касательно рекомбинантной экспрессии человеческих иммуноглобулинов, например, в клетках НЕК293, дана, например, в Meissner, P., et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Очистка

а) GFP-гибридные полипептиды очищали с помощью двухэтапной процедуры, включающей хроматографию на белке А и эксклюзионную хроматографию на колонке Superdex 200™

Клеточные культуральные супернатанты, содержащие GFP-гибридные полипептиды, фильтровали. После этого GFP-гибридные полипептиды захватывали путем аффинной хроматографии с использованием колонки HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare), уравновешенной PBS (1 мМ КН₂РO₄, 10 мМ NaHPO₄, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7,4). Несвязанные полипептиды удаляли путем промывания уравновешивающего буфера, и гибридный полипептид извлекали с помощью 0,1 М цитратного буфера, pH 2,8. Сразу после элюирования фракции нейтрализовали до pH 6,0 с помощью 1 М Трис-основания, pH 9,0.

Эксклюзионную хроматографию на Superdex 200™ (GE Healthcare, Упсала, Швеция) использовали в качестве второго этапа очистки. Эксклюзионную хроматографию проводили в 50 мМ гистидиновом буфере, 0,15 М NaCl, pH 6,8. Выделенные GFP-гибридные полипептиды хранили при -80°C.

б) Гистидин-меченные белки очищали с помощью двухэтапного протокола, начиная с аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла (ИМАС), и продолжая эксклюзионной хроматографией на колонке с Superdex 75™.

Клеточные культуральные супернатанты, содержащие гистидин-меченные

полипептиды, подводили с помощью NaCl до конечной концентрации NaCl 500 мМ. Отфильтрованный культуральный супернатант наносили на колонку Ni-Sephарose™ 6 Fast Flow, предварительно уравновешенную NiA-буфером (50 мМ Tris, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, содержащий таблетку смеси ингибиторов протеаз без EDTA, как указано в инструкции производителя; EDTA-free Complete Mini Tablets; Roche Applied Science) со скоростью потока 1 мл/мин с использованием системы АКТА explorer 100 (GE Healthcare, Упсала, Швеция). Колонку промывали NiA-буфером до тех пор, пока показатели УФ не возвращались к исходному уровню. Гистидин-меченный полипептид элюировали линейным градиентом имидазола от 5 мМ до 300 мМ в 50 мМ TRIS и 500 мМ NaCl, pH 8,0, в 10 объемах колонки.

Эксклюзионную хроматографию на Superdex 75™ (GE Healthcare, Упсала, Швеция) использовали в качестве второго этапа очистки. Эксклюзионную хроматографию проводили в 50 мМ гистидиновом буфере, 0,15 М NaCl, pH 6,8. Элюированные гистидин-меченные белки хранили при -80°C.

15 Аналитическая характеристика

Белковые концентрации очищенных полипептидов определяли путем измерения оптической плотности (OD) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основании аминокислотной последовательности. Чистоту и надлежащее образование димеров полипептидов анализировали с помощью SDS-PAGE в присутствии и в отсутствие восстанавливающего агента (5 мМ 1,4-дителиотреитол) и окрашивания Кумасси бриллиантовым синим. Содержание агрегатов в препаратах Fc-гибридных полипептидов определяли с помощью высокоэффективной SEC с использованием аналитической эксклюзионной колонки Superdex 200™ (GE Healthcare, Упсала, Швеция). Целостность аминокислотного остова выделенных полипептидов подтверждали с помощью масс-спектрометрии на Nano Electrospray QTOF после удаления N-гликанов путем ферментативной обработки комбинацией нейраминидазы, O-гликаназы и пептид-N-гликозидазы F (Roche Applied Science, Мангейм, Германия).

Определение концентрации BDNF в культуральных супернатантах

Концентрацию BDNF дикого типа, вариантов BDNF и гибридных полипептидов, содержащих BDNF, в культуральных супернатантах определяли путем полуквантитативного анализа вестерн-блота с использованием рекомбинантного человеческого BDNF от Peprotech (каталоговый номер: 450-02) в качестве референсного стандарта. Для окрашивания использовали кроличье анти-BDNF-антитело (Santa Cruz, каталоговый номер: SC-20981) (первое антитело), конъюгированную с пероксидазой хрена овечью противокроличью антисыворотку (разведение 1:5000, Roche Diagnostics GmbH, Германия) (вторичное антитело) и усиленный хемилюминесцентный субстрат (LUMI-Light plus Western Blotting substrate, Roche Diagnostics GmbH, Германия).

Концентрацию BDNF-гибридных полипептидов также определяли путем BDNF ELISA с использованием набора BDNF Emax® ImmunoAssay Kit от Promega (каталоговый номер: G7610) в соответствии с инструкциями поставщика.

Пример 8

Функциональная характеристика *in vitro*

Определение биологической активности GFP дикого типа и GFP-содержащих гибридных полипептидов

45 Биологическую активность очищенного GFP дикого типа и GFP-содержащих гибридных полипептидов контролировали с помощью их свойств биолюминесценции (GFP-специфическая флуоресценция).

Определение аффинности связывания BDNF с помощью поверхностного плазмонного

резонанса (SPR, BIAcore)

Аминное сочетание примерно 750 резонансных единиц (RU) в системе захвата (захват МКА, специфичного для человеческого IgG, Jackson Immunoresearch) выполняли на чипе CM5 при pH 4,5 с использованием набора для аминного связывания в соответствии с инструкцией производителя (поставляется компанией GE Healthcare, Упсала, Швеция). Человеческий Fc-меченый TrkB (R&D Systems, каталоговый номер: 688-ТК-100) захватывали в концентрации 5 мкг/мл. Избыточные сайты связывания блокировали путем введения смеси человеческих Fc в концентрации 1,25 мкМ (Biodesign, каталоговый номер: 50175). Различные концентрации BDNF-содержащих гибридных полипептидов в интервале от 0,1 нМ до 50 нМ пропускали со скоростью потока 10 мкл/мин через проточные ячейки при 298 К в течение 120-240 с. Фазу диссоциации наблюдали в течение периода до 600 с и прерывали путем переключения с раствора образца на проточный буфер. Поверхность подвергали регенерации путем промывания в течение 1 мин 100 мМ раствором фосфорной кислоты со скоростью потока 30 мкл/мин. Для всех экспериментов был выбран буфер HBS-P+, поставляемый компанией GE Healthcare (10 мМ HEPES ((4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)), pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05% (об/об) поверхностно-активного вещества P20).

Разницу в объемных рефракционных показателях корректировали путем вычитания ответа, полученного для поверхности, связанной с бланком. Пустые введения также вычитали (двойной референс).

Константу равновесной диссоциации (K_d), определенную как ka/kd , определяли с помощью анализа кривых сенсограммы, полученных с несколькими различными концентрациями, используя пакет программного обеспечения BIAevaluation 4.1. После подгонки данных следовала подходящая модель связывания.

Определение аффинности связывания BDNF с помощью ELISA

Связывающие свойства BDNF-содержащих гибридных белков определяли с помощью ELISA TrkB. Планшеты Maxisorb покрывали 1 мкг/мл гибридного TrkB-Fc (R&D Systems) в PBS в течение ночи при температуре 4°C. После блокировки планшета с помощью PBSTC (PBS с 0,05% Tween-20 и 2% куриной сыворотки (Gibco)) в течение 1 ч при комнатной температуре и трех промываний с помощью PBST BDNF-содержащие гибридные белки или в только BDNF добавляли в лунки в концентрациях от 15 до 500 нг/мл в PBSTC и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После шести промываний лунки инкубировали с мышинным анти-BDNF-антителом (клон 4F11.1A1, 1 мкг/мл в PBSTC) и, после дополнительных промываний, с противомышиным HRP-антителом (1:10000 в PBSTC), обе инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех промываний с помощью PBST определяли активность HRP с использованием ABTS-субстрата и фотометрической оценки при длине волны 492 нм.

Определение биологической активности BDNF-содержащих гибридных белков с помощью анализа с репортерным геном TrkB

Биологическую активность BDNF-вариантов и BDNF-содержащих гибридных белков определяли с помощью TrkB-трансфицированных клеток линии CHO, содержащий стабильно трансфицированный ген-репортер люциферазы под контролем SRE (элемент ответа сыворотки)-содержащего промотора (CHO-K1-hTrkB/pSRE-Luc). За день до экспериментов клеточную среду заменяли с ростовой среды (среда Хэма F12, содержащая 10% FCS, 2 мМ L-глутамин, 300 мкг/мл G418 и 3 мкг/мл пуромицина) на такую же среду без FCS. На следующий день, 10^5 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет в 50 мкл среды, а затем BDNF добавляли гибридные белки в концентрациях от 0,02 нМ до 115 нМ в 50 мкл среды. После инкубации в течение 4 ч

при 37°C, 7,5% CO₂, клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и в каждую лунку добавляли 100 мкл реагента BrightGlo Luciferase Assay reagent (Promega). Люминисценцию считывали после 5-минутной инкубации, используя планшетный ридер Tecan (время интегрирования 100 мс).

5 Определение биологической активности BDNF-содержащих гибридных белков в анализе роста нейритов SH-SY5Y

Биологическую активность BDNF-вариантов и BDNF-содержащих гибридных белков определяли с помощью анализа роста нейритов с использованием клеток человеческой нейробластомы SH-SY5Y. Вкратце, клетки SH-SY5Y высевали в 96-луночный планшет с плотностью 4000 клеток на лунку в нормальной ростовой среде (среда Хэма F12, 1x заменимые аминокислоты (PAN), 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 1x пируват натрия (PAN)) с добавлением 10 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma), чтобы индуцировать дифференцировку нейронов. Через три дня среду заменяли ростовой средой, содержащей различные концентрации BDNF-гибридных белков. После трех дополнительных дней 15 клетки фиксировали с использованием 4% параформальдегида в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали, быстро пермеабелизовали (0,1% Тритон-X-100), блокировали 1% BSA в PBS и окрашивали на анти-бета-тубулиновую иммунореактивность с использованием антитела TuJ1 (Covance) в разведении 1:1000 в PBS/1% BSA, с последующими тремя промываниями и инкубацией с Alexa-488-меченным 20 противокозлиным антителом (Invitrogen). Число нейритов определяли путем флуоресцентной микроскопии, оценивая одно поле зрения на лунку.

Определение связывающей активности гибридных белков, содержащих антитело/фрагмент антитела, с помощью FACS

Связывающая активность BDNF-гибридных белков с соответствующими целевыми рецепторами (рецептор трансферрина, IGF-1R) определяли с помощью FACS. Клетки, экспрессирующие соответствующий рецептор (мышинный рецептор трансферрина: мышинные эмбриональные фибробласты MEF-1; IGF-1R: фибробласты 3T3, стабильно трансфицированные человеческим IGF-1R) собирали из их ростовых сред, промывали 25 PBS и ресуспендировали в буфере FACS (PBS + 5% FCS; 100 мкл, содержащие 3×10^5 30 клеток на лунку в 96-луночном круглодонном планшете). Первичное антитело (в зависимости от используемого BDNF-гибридного белка, например, противочеловеческий Fab (Jackson ImmunoResearch) или анти-His6-антитело (Roche)) добавляли в концентрации 1-10 мкг/мл и клетки инкубировали в течение 2 ч на льду. После трех промываний 35 буфером FACS связанное антитело обнаруживали с использованием PE-меченого вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch, 1:5000 - 1:10000) в течение одного часа на льду. Клетки снова промывали и измеряли среднюю флуоресценцию на цитометре FACS Canto (Becton-Dickinson).

(57) Формула изобретения

40 1. Способ получения рекомбинантного полипептида нейротрофина, включающий следующие этапы:

- культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид нейротрофина в виде прополипептида, состоящего из просегмента и полипептида, в котором эндогенный сайт ферментативного расщепления между просегментом и полипептидом заменен сайтом расщепления IgA-протеазой, где 45 указанная клетка млекопитающего экспрессирует указанный прополипептид;
- добавление IgA-протеазы в культивационную среду с расщеплением прополипептида на просегмент и полипептид;

- извлечение рекомбинантного полипептида из культивационной среды и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида нейротрофина, при этом указанная клетка млекопитающего не является эмбриональной клеткой человека.

5 2. Способ получения рекомбинантного полипептида нейротрофина, включающий следующие этапы:

- культивирование клетки млекопитающего, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид нейротрофина в виде прополипептида, состоящего из просегмента и полипептида, в котором эндогенный сайт ферментативного расщепления
10 между просегментом и полипептидом заменен сайтом расщепления IgA-протеазой, где указанная клетка млекопитающего экспрессирует указанный прополипептид;

- извлечение прополипептида из культивационной среды или клетки;

- обработка прополипептида IgA-протеазой с расщеплением прополипептида на просегмент и полипептид и, таким образом, получение рекомбинантного полипептида
15 нейротрофина,

при этом указанная клетка млекопитающего не является эмбриональной клеткой человека.

3. Способ по п. 1 или 2, где нейротрофин выбран из фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофина 3 (NT-3) и
20 нейротрофина 4 (NT-4).

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> УЛУЧШЕННЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА

<130> P31357-WO

<150> EP13198738.0

<151> 2013-12-20

<160> 109

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GlySer-linker

<400> 1

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

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> enhanced green fluorescent protein

<400> 2

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

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

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

RU 2711 322 C1

2

85

90

95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 3

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> emerald green fluorescent protein

<400> 3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

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

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

RU 2711 322 C1

3

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 4
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> tagGFP

<400> 4

Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile

<211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-IGF-1R antibody HC

<400> 5

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

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

RU 2711 322 C1

6

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

7

<210> 6
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> anti-IGF-1R antibody LC

 <400> 6

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
 85 90 95

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

 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

RU 2711 322 C1

8

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 715
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-IGF-1R antibody HC - eGFP fusion polypeptide

<400> 7

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

RU 2711 322 C1

9

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Met Val Ser Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 485 490 495

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 515 520 525

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly
 530 535 540

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 545 550 555 560

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 565 570 575

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 580 585 590

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 595 600 605

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 610 615 620

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 625 630 635 640

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 645 650 655

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
660 665 670

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
675 680 685

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
690 695 700

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
705 710 715

<210> 8

<211> 715

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-IGF-1R antibody HC - emGFP fusion polypeptide

<400> 8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

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

RU 2711 322 C1

12

130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

RU 2711 322 C1

14

```

610              615              620

His Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
625              630              635              640

Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
645              650              655

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
660              665              670

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
675              680              685

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
690              695              700

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
705              710              715

<210> 9
<211> 714
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-IGF-1R antibody HC - tagGFP fusion polypeptide

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20              25              30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35              40              45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50              55              60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65              70              75              80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85              90              95

```

RU 2711 322 C1

15

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Met Ser Gly Gly
 465 470 475 480

Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile Glu Leu Asp Gly
 485 490 495

Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu Gly Glu Gly Asp
 500 505 510

Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
 515 520 525

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Cys Tyr Gly Ile
 530 535 540

Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met Asn Asp Phe Phe
 545 550 555 560

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg Thr Ile Gln Phe
 565 570 575

Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val Lys Phe Glu Gly
 580 585 590

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys Asp Phe Lys Glu
 595 600 605

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser Phe Asn Ser His
 610 615 620

Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640

Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp
 645 650 655

His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro Val Leu Ile Pro
 660 665 670

Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser Lys Asp Arg Asn
 675 680 685

Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe Ser Ala Cys Cys
 690 695 700

His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg
 705 710

<210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> human opsin receptor derived polypeptide = opsin-tag
 <400> 10

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

Gly Val Val

<210> 11
 <211> 734
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-IGF-1R antibody HC eGFP opsin-tag fusion polypeptide

<400> 11

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

RU 2711 322 C1

19

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

RU 2711 322 C1

20

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Met Val Ser Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 485 490 495

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 515 520 525

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly
 530 535 540

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 545 550 555 560

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 565 570 575

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 580 585 590

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 595 600 605

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 610 615 620

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 625 630 635 640

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 645 650 655

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 660 665 670

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 675 680 685

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 690 695 700

RU 2711 322 C1

21

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Gly
705 710 715 720

Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val
725 730

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T7-His6 tag

<400> 12

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly His His His His His
1 5 10 15

His

<210> 13
<211> 267
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro-BDNF-T7-His6

<400> 13

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

RU 2711 322 C1

22

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
 245 250 255

Gly Gln Gln Met Gly His His His His His His
 260 265

<210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> short opsin-tag

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> long opsin-tag

<400> 16

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

Gly Val Val Arg
 20

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> glycosylation-tag

<400> 17

Ala Ala Ala Asn Gly Thr Gly Gly Ala
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> glycosylation-tag

<400> 18

Ala Asn Ile Thr Val Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> glycosylation-tag

<400> 19

Asn Ala Thr Gly Ala Asp Asn Gly Thr Gly Ala Ser
 1 5 10

<210> 20
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

25

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
 245

<210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Val Arg Arg
 1

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgA protease cleavage sequence

<400> 22

Gly Ser Val Val Ala Pro Pro Ala Pro
 1 5

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> His6-tag

<400> 23

His His His His His His
1 5

<210> 24
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Gly Arg
1

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
1 5 10 15

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
20 25 30

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
35 40 45

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
50 55 60

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
65 70 75 80

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
85 90 95

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
100 105 110

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
115

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

27

<223> linker peptide

<400> 26

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

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 27

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 28

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker peptide

<400> 29

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser
20

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> linker peptide

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> linker peptide

<400> 31

Gly Gly Asp Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly

<210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> linker peptide

<400> 32

Gly Gly Asp Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Ser

<210> 33
 <211> 734
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HC<IGF-1R>_(G4S)2G_eGFP-2N

RU 2 711 322 C1

29

<400> 33

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Met Val Ser Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 485 490 495

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 515 520 525

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly
 530 535 540

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 545 550 555 560

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 565 570 575

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 580 585 590

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 595 600 605

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 610 615 620

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 625 630 635 640

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 645 650 655

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 660 665 670

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 675 680 685

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 690 695 700

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Gly
 705 710 715 720

Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val
 725 730

<210> 34
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pro (wt) - mBDNF (wt) - T7 - His6

<400> 34

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

RU 2711 322 C1

33

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
 245 250 255

Gly Gln Gln Met Gly His His His His His His
 260 265

<210> 35
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pro (wt) - mBDNF (deltaRGR) (wt) - T7 - His6

<400> 35

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 36
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF (deltaRGR)-GSG-2N-GSG-T7-His6 (opsin-S)

<400> 36

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

RU 2711 322 C1

35

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr
 245 250 255

Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
 260 265 270

Gly Gln Gln Met Gly His His His His His His
 275 280

<210> 37
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF (deltaRGR)-GSG-2N-GSG-His6 (opsin-S)

<400> 37

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr
 245 250 255

Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Ser Gly His His His His His His
 260 265 270

<210> 38
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF (deltaRGR)-GSG-2N-GSG-His6 (opsin-L

<400> 38

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

RU 2711 322 C1

38

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr
 245 250 255

Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg His His His His His
 260 265 270

His

<210> 39
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF - GSG - 2NIT - His6

<400> 39

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Ala Asn Ile Thr Val Asn Ile Thr Val
 245 250 255

Gly Ser Gly His His His His His His
 260 265

RU 2711 322 C1

40

<210> 40
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF - GSG - NGT - His6

<400> 40

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

RU 2711 322 C1

41

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Ala Ala Ala Asn Gly Thr Gly Gly Ala
 245 250 255

His His His His His His
 260

<210> 41
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> proBDNF - GSG - 2NAT - His6

<400> 41

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

RU 2711322 C1

42

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Ala Thr Gly Ala Asp Asn Gly Thr
 245 250 255

Gly Ala Ser His His His His His His
 260 265

<210> 42
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; M61T)-T7-His6

<400> 42

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

RU 2711 322 C1

43

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Thr Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His
 260

<210> 43
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> pro(BDNF) - IgA-Site - mBDNF - GSG - His6

<400> 43

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

RU 2711 322 C1

45

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly His His His His
245 250 255

His His

<210> 44
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pro(BDNF) R54A -mBDNF - GSG - His6

<400> 44

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Ala Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

RU 2711 322 C1

46

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly His His His His His His
245 250

<210> 45
<211> 263
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> His6 - pro(BDNF) R54A - IgA-Site - mBDNF

<400> 45

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile His His His His His His
20 25 30

Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu Ala Tyr
35 40 45

Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys
50 55 60

Ala Gly Ser Ala Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val
65 70 75 80

Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu
85 90 95

Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu Ser Ser
 100 105 110

Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys
 115 120 125

Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val Ala Pro
 130 135 140

Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys
 145 150 155 160

Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val
 165 170 175

Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser
 180 185 190

Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met
 195 200 205

Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn
 210 215 220

Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp
 225 230 235 240

Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys
 245 250 255

Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys
 260

<210> 46
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> His6 - pro(BDNF) R54A - mBDNF

<400> 46

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

RU 2711 322 C1

48

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile His His His His His His
 20 25 30

Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu Ala Tyr
 35 40 45

Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys
 50 55 60

Ala Gly Ser Ala Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val
 65 70 75 80

Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu
 85 90 95

Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu Ser Ser
 100 105 110

Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys
 115 120 125

Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His Ser
 130 135 140

Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu
 145 150 155 160

Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly
 165 170 175

Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys
 180 185 190

Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu
 195 200 205

Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr
 210 215 220

Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile
 225 230 235 240

Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Lys

<210> 47

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ProBDNF P60E, K65D, K73D, K95A - GSG - T7 - His6

<400> 47

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Glu Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Asp Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Ala Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 48
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ProBDNF K65D, K73D, K95A, R97A - GSG - T7 - His6

<400> 48

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

RU 2711 322 C1

51

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Asp Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Ala Lys
 210 215 220

Ala Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 49
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ProBDNF - GSG - myc - His6

<400> 49

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 245 250 255

Leu Gly Ser Gly His His His His His His
 260 265

<210> 50
 <211> 278

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)-opsin(L)

<400> 50

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1                               5                               10                               15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
                20                               25                               30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
                35                               40                               45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
    50                               55                               60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65                               70                               75                               80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
                100                               105                               110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
                115                               120                               125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
    130                               135                               140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145                               150                               155                               160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
                165                               170                               175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
    180                               185                               190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
    195                               200                               205
    
```

RU 2711 322 C1

54

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 51
<211> 294
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)-opsin(L)-myc-His6

<400> 51

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
260 265 270

Gly Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Gly
275 280 285

His His His His His His
290

<210> 52
<211> 268
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)-myc-His6

<400> 52

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

RU 2711 322 C1

56

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Glu Gln Lys Leu
 245 250 255

Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 260 265

<210> 53
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)-His6

<400> 53

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly His His His His
 245 250 255

His His

<210> 54
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)-opsin(L)-His6

<400> 54

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

RU 2711 322 C1

59

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 55
<211> 278
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; K25N)-opsin(L)-His6

<400> 55

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

RU 2711 322 C1

60

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

His His His His His His
275

<210> 56
<211> 278
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; T35N)-opsin(L)-His6

<400> 56

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

RU 2711 322 C1

62

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

His His His His His His
 275

<210> 57
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; K25N, T35N)-opsin(L)-His6

<400> 57

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

His His His His His
 275

<210> 58
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; K25N, T35N, R81N)-T7-His6

<400> 58

RU 2711 322 C1

64

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

RU 2711 322 C1

65

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met
 245 250 255

Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly His His His His His His
 260 265

<210> 59
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; K25N, T35N, Q79T, R81N)-T7-His6

<400> 59

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

RU 2711 322 C1

66

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Thr Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met
245 250 255

Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly His His His His His His
260 265

<210> 60

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; G62N, Y63G)-opsin(L)-His6

<400> 60

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

RU 2711 322 C1

67

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Asn Gly Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

His His His His His His
 275

- <210> 61
- <211> 278
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; G62N, Y63G, K25N, T35N)-opsin(L)-His6
- <400> 61

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

RU 2711 322 C1

68

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Asn Gly Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

His His His His His His
 275

<210> 62
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; G62N, Y63G, Q79T)-T7-His6

<400> 62

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

RU 2711 322 C1

70

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His
 260

<210> 63
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; T35N, Q79T)-T7-His6

<400> 63

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 64
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; K25N, Q79T)-T7-His6

<400> 64

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

RU 2711 322 C1

72

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 65
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro-BDNF(-RGR; T35N, G62N, Y63G, Q79T)-T7-His6

<400> 65

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 66

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF(-RGR; T35N; G62N; Y63G)-T7-His6

<400> 66

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

RU 2711 322 C1

75

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His
 260

<210> 67
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; K25N; G62N; Y63G)-T7-His6

<400> 67

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

RU 2711 322 C1

76

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 68
<211> 264

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; K25N; T35N)-T7-His6

<400> 68

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

RU 2711 322 C1

78

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 69

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF(-RGR; G62N, Y63G, R81N)-T7-His6

<400> 69

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

RU 2711322 C1

79

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His
260

<210> 70

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF(-RGR; K25N; T35N; Q79T)-T7-His6

<400> 70

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

RU 2711 322 C1

80

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His
260

<210> 71
<211> 480
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)2GG_VL<IGF-1R>-Ck-His6

RU 2711 322 C1

81

<400> 71

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 260 265 270

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 275 280 285

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 290 295 300

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 325 330 335

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
 340 345 350

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg Thr Val Ala
 355 360 365

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 370 375 380

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 405 410 415

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 420 425 430

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 435 440 445

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 450 455 460

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly His His His His His His
 465 470 475 480

<210> 72
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)4GG_VL<IGF-1R>-Ck-His6

 <400> 72

 Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

 Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

 Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

 Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

 His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

 Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

 Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

 His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

 Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

 Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

 Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

RU 2711 322 C1

84

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln
 260 265 270

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 275 280 285

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 290 295 300

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg
 305 310 315 320

Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 340 345 350

Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
 355 360 365

Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 370 375 380

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 385 390 395 400

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 405 410 415

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 420 425 430

RU 2711 322 C1

85

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 435 440 445

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 450 455 460

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 465 470 475 480

Cys Gly Ser Gly His His His His His His
 485 490

<210> 73

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)6GG_VL<IGF-1R>-Ck-His6

<400> 73

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 275 280 285

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 290 295 300

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 305 310 315 320

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 325 330 335

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 340 345 350

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 355 360 365

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
 370 375 380

RU 2711 322 C1

87

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
385 390 395 400

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
405 410 415

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
420 425 430

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
435 440 445

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
450 455 460

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
465 470 475 480

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Gly His His
485 490 495

His His His His
500

<210> 74
<211> 481
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)2GG_VH<IGF-1R>-CH1-His6

<400> 74

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

RU 2711 322 C1

88

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
260 265 270

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
275 280 285

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
290 295 300

RU 2711 322 C1

89

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
305 310 315 320

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
340 345 350

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
355 360 365

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
370 375 380

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
385 390 395 400

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
405 410 415

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
420 425 430

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
435 440 445

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
450 455 460

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His His His His
465 470 475 480

His

<210> 75

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)4GG_VH<IGF-1R>-CH1-His6

<400> 75

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

RU 2711 322 C1

90

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu
 260 265 270

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys
 275 280 285

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 290 295 300

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

Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile
 325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 340 345 350

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg
 355 360 365

Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser
 370 375 380

Ala Ser Thr Lys Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 385 390 395 400

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 405 410 415

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 420 425 430

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 435 440 445

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 450 455 460

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 465 470 475 480

Lys Val Gly Ser Gly His His His His His His
 485 490

<210> 76
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGD)_(G4S)6GG_VH<IGF-1R>-CH1-His6

 <400> 76

 Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

 Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

 Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

 Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

 His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

 Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

 Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

 His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

 Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

 Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

 Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

RU 2711 322 C1

93

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
 275 280 285

Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 290 295 300

Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr
 325 330 335

Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 340 345 350

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 355 360 365

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp
 370 375 380

Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 385 390 395 400

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 405 410 415

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 420 425 430

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 435 440 445

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 450 455 460

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 465 470 475 480

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His
 485 490 495

His His His His His
 500

<210> 77
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF-(G3D)4-G3S-VH<IGF-1R>-CH1

<400> 77

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp
 245 250 255

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gln Val Glu Leu
 260 265 270

Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu
 275 280 285

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp
 290 295 300

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp
 305 310 315 320

Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe
 325 330 335

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 340 345 350

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu
 355 360 365

Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val
 370 375 380

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 385 390 395 400

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 420 425 430

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 435 440 445

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 450 455 460

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 465 470 475 480

Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His His His His His
 485 490

<210> 78
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF-(G4S)3-VL<IGF-1R>-(G4S)4-VH<IGF-1R>-His6

<400> 78

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

RU 2711 322 C1

97

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
260 265 270

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
275 280 285

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
290 295 300

RU 2711 322 C1

98

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
305 310 315 320

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
325 330 335

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys
340 345 350

Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
385 390 395 400

Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
405 410 415

Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
420 425 430

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr
435 440 445

Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
450 455 460

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
465 470 475 480

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu
485 490 495

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser His His His His His
500 505 510

His

<210> 79
<211> 517
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pro(BDNF) - IgA-Site - mBDNF - GSG - 2N - (G3D)4 - G3S - VH (8D3)
- CH1 - GSG - His6

<400> 79

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr

RU 2711 322 C1

100

210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp
 275 280 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 290 295 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr
 305 310 315 320

Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly
 325 330 335

Leu Glu Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr
 340 345 350

Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 355 360 365

Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 370 375 380

Met Tyr Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp
 385 390 395 400

Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 405 410 415

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 420 425 430

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 435 440 445

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

RU 2711 322 C1

101

450 455 460

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
465 470 475 480

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
485 490 495

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His
500 505 510

His His His His His
515

<210> 80
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL_8D3_chim. Ab rat-anti-murTfR VL _ hum const.

<400> 80

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile
35 40 45

Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg
85 90 95

Val Gln Val Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn
100 105 110

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
115 120 125

RU 2711322 C1

102

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 81
<211> 517
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR;
R81N)_opsin(L)-(G3D)4-G3S_VH<TfR>8D3-CH1-His6

<400> 81

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

RU 2711 322 C1

103

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
260 265 270

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp
275 280 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
290 295 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr
305 310 315 320

RU 2711 322 C1

104

Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly
 325 330 335

Leu Glu Trp Ile Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr
 340 345 350

Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 355 360 365

Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 370 375 380

Met Tyr Tyr Cys Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp
 385 390 395 400

Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 405 410 415

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 420 425 430

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 435 440 445

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 450 455 460

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 465 470 475 480

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 485 490 495

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His
 500 505 510

His His His His His
 515

<210> 82

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro-BDNF-IgA-mBDNF(R81N)-GSG-2N-His6

RU 2711 322 C1

105

<400> 82

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 83
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> proBDNF (deltaRGR)-GSG-T7-His6

<400> 83

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

RU 2711 322 C1

107

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 84

<211> 494

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)_(G3D)4-G3S_VH<IGF-1R>-CH1-His6

<400> 84

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

RU 2711 322 C1

108

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly
245 250 255

Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gln Val Glu
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile
305 310 315 320

Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg
 325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 340 345 350

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu
 355 360 365

Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser
 370 375 380

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 420 425 430

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 435 440 445

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 450 455 460

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 465 470 475 480

Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His His His His
 485 490

<210> 85
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)_(G3D)4-G3S_VH<IGF-1R>-CH1-EPKSC-His6

<400> 85

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

RU 2711 322 C1

110

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly
 245 250 255

RU 2711 322 C1

111

Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gln Val Glu
 260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg
 275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile
 305 310 315 320

Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg
 325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 340 345 350

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu
 355 360 365

Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser
 370 375 380

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 420 425 430

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 435 440 445

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 450 455 460

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 465 470 475 480

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly His His His
 485 490 495

His His His

<210> 86
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR;
 R81N)_opsin(L)-(G3D)4-G3S_VH<IGF-1R>-CH1-His6

<400> 86

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn

RU 2711 322 C1

114

420 425 430

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
435 440 445

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
450 455 460

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
465 470 475 480

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
485 490 495

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His
500 505 510

His His His His His
515

<210> 87
<211> 516
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR; R81N)_opsin(L)-(G2D)5-G2SG
_VH<IGF-1R>-CH1-His6

<400> 87

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

RU 2711 322 C1

115

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Gly Thr Glu
 245 250 255

Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Ala Thr Gly Val Val Arg
 260 265 270

Gly Gly Asp Gly
 275 280 285

Gly Ser Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 290 295 300

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 305 310 315 320

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 340 345 350

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 355 360 365

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 370 375 380

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 385 390 395 400

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 405 410 415

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 420 425 430

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 435 440 445

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 450 455 460

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 465 470 475 480

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 485 490 495

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His
 500 505 510

His His His His
 515

<210> 88
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF- (G3D)4-G3S-VH<IGF-1R>-CH1

<400> 88

RU 2711 322 C1

117

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

RU 2711 322 C1

118

Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp
 245 250 255

Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gln Val Glu Leu
 260 265 270

Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu
 275 280 285

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp
 290 295 300

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp
 305 310 315 320

Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe
 325 330 335

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 340 345 350

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu
 355 360 365

Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val
 370 375 380

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 385 390 395 400

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 405 410 415

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 420 425 430

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 435 440 445

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 450 455 460

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 465 470 475 480

119

Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His His His His His
 485 490

<210> 89
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; R81N)-T7-His6

<400> 89

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

120

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

<210> 91
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; Q79S)-T7-His6

<400> 91

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn

RU 2711 322 C1

122

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Asn Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

RU 2711 322 C1

123

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 93
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; K25N)-T7-His6

<400> 93

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Asn Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln

RU 2711 322 C1

124

165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 94
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; D30N)-T7-His6

<400> 94

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

RU 2711 322 C1

125

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asn Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His
260

<210> 95
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; G33N)-T7-His6

<400> 95

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu

260

<210> 96
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; T35N)-T7-His6

<400> 96

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 97
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; P43N)-T7-His6

<400> 97

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg

RU 2711 322 C1

129

115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Asn Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 98
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; P43N, V42G)-T7-His6

<400> 98

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

RU 2711 322 C1

130

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Gly Asn Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 99
<211> 264
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; M61S, P60G)-T7-His6

<400> 99

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Gly Ser Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys

RU 2711 322 C1

132

210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 100
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; G62N, Y63G)-T7-His6

<400> 100

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Asn Gly Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 101

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; Q79T)-T7-His6

<400> 101

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn

RU 2711 322 C1

135

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Asn Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

136

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 103
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; M92N)-T7-His6

<400> 103

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln

RU 2711 322 C1

137

165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Asn Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
245 250 255

Met Gly His His His His His His
260

<210> 104
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pre-pro-BDNF(-RGR; D106N)-T7-His6

<400> 104

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

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

138

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asn Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 105
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pre-pro-BDNF(-RGR; T112N)-T7-His6

<400> 105

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu

140

260

<210> 106
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro-BDNF(-RGR; Q79T, R81N)-T7-His6

<400> 106

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg
 115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 180 185 190

141

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Thr Cys
 195 200 205

Asn Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Gly Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
 245 250 255

Met Gly His His His His His His
 260

<210> 107

<211> 499

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)_(G3D)4-G3S_VH<TfR>8D3-CH1-EPKSC-His6

<400> 107

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val

RU 2711 322 C1

142

	115						120							125	
Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	His	Ser	Asp	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Glu	Leu	Ser
	130						135							140	
Val	Cys	Asp	Ser	Ile	Ser	Glu	Trp	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Lys	Lys	Thr
	145					150					155				160
Ala	Val	Asp	Met	Ser	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Val	Pro
				165					170					175	
Val	Ser	Lys	Gly	Gln	Leu	Lys	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Thr	Lys	Cys	Asn
			180					185					190		
Pro	Met	Gly	Tyr	Thr	Lys	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Lys	Arg	His
		195					200					205			
Trp	Asn	Ser	Gln	Cys	Arg	Thr	Thr	Gln	Ser	Tyr	Val	Arg	Ala	Leu	Thr
	210						215					220			
Met	Asp	Ser	Lys	Lys	Arg	Ile	Gly	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr
	225				230					235					240
Ser	Cys	Val	Cys	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly
				245					250					255	
Asp	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Thr
		275					280					285			
Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His
	290					295					300				
Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala	Met	Ile
	305				310					315					320
Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Lys	Met	Asn	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg
				325					330					335	
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Met
			340					345					350		
Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Val	Pro

RU 2711 322 C1

143

355 360 365

Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr
 370 375 380

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 420 425 430

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 435 440 445

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 450 455 460

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 465 470 475 480

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly His His His
 485 490 495

His His His

<210> 108
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)_(G3D)4-G3S_VH<Tfr>8D3-CH1-His6

<400> 108

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
 225 230 235 240

Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly
 245 250 255

Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Thr
 275 280 285

RU 2711 322 C1

145

Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
 290 295 300

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Met Ile
 305 310 315 320

Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg
 325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met
 340 345 350

Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Val Pro
 355 360 365

Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr
 370 375 380

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 420 425 430

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 435 440 445

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 450 455 460

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 465 470 475 480

Val Asp Lys Lys Val Gly Ser Gly His His His His His His
 485 490

<210> 109
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-pro(IgA)-BDNF(-RGR)_(G3D)4-G3S_VH<TfR>8D3-CH1

<400> 109

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
 35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
 50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn
 65 70 75 80

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

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
 100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Gly Ser Val Val
 115 120 125

Ala Pro Pro Ala Pro His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser
 130 135 140

Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro
 165 170 175

Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn
 180 185 190

Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His
 195 200 205

Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr
 210 215 220

Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr

148

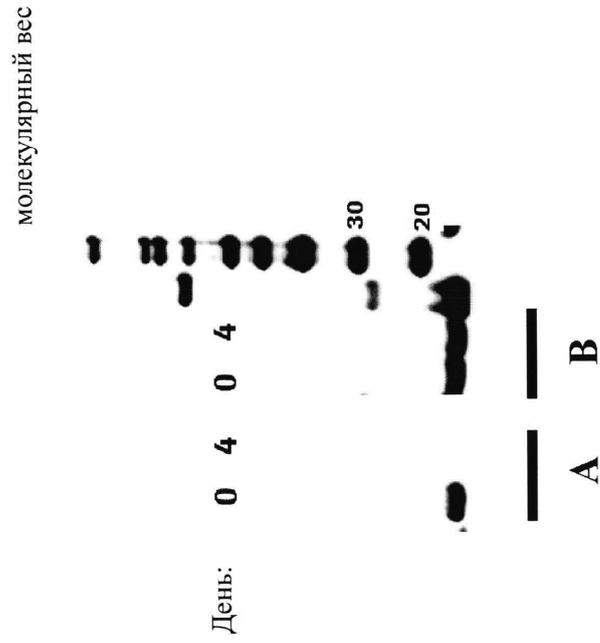
465

470

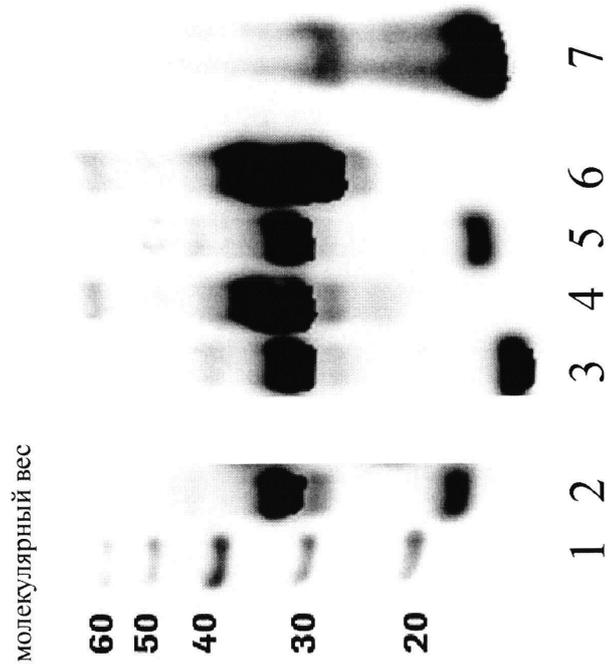
475

480

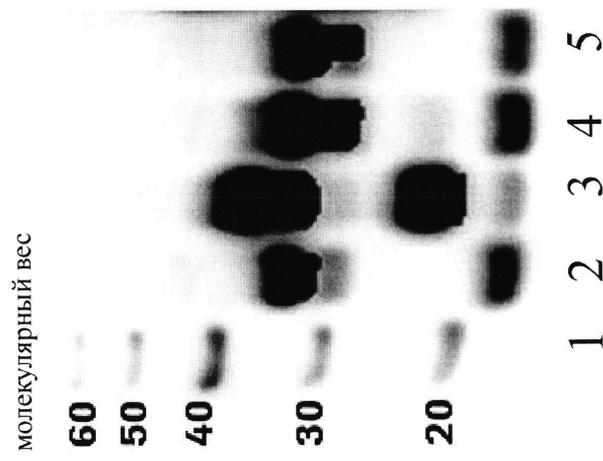
Val Asp Lys Lys Val
485



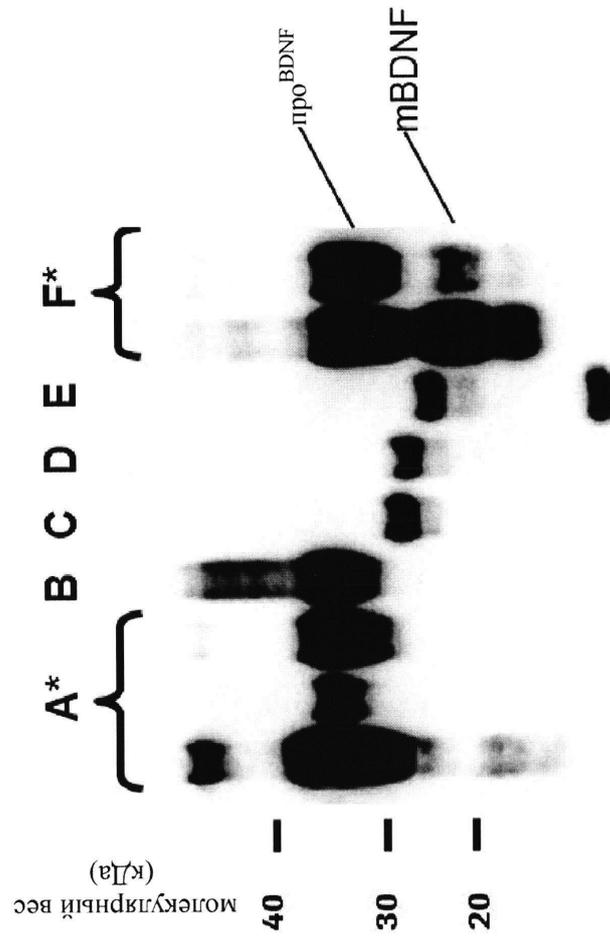
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



Фиг. 4