

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201490703 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2014.09.30

(51) Int. Cl. C40B 50/00 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.09.27

(54) БЕЛКОВЫЕ КАРКАСЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОНЕКТИНОВОГО ПОВТОРА ТИПА III С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ПОВЕРХНОСТЯМИ СВЯЗЫВАНИЯ

(31) 61/539,670

(32) 2011.09.27

(33) US

(86) PCT/US2012/057436

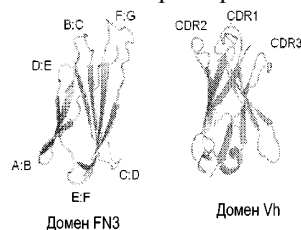
(87) WO 2013/049275 2013.04.04

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дим Майкл, Джекобс Стивен (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Белковые каркасы и библиотеки каркасов на основе фибронектинового повтора типа III (FN3) с альтернативной конфигурацией поверхности связывания, выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие белковые каркасы, векторы, клетки-хозяева и способы их получения могут применяться в создании терапевтических молекул и лечении и диагностике заболеваний и расстройств.



201490703

A1

A1

201490703

БЕЛКОВЫЕ КАРКАСЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОНЕКТИНОВОГО ПОВТОРА ТИПА III С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ПОВЕРХНОСТЯМИ СВЯЗЫВАНИЯ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к белковым каркасам и библиотекам каркасов на основе фибронектинового повтора типа III (FN3) с альтернативными конфигурациями поверхности связывания. Более конкретно настоящее изобретение относится к каркасам и библиотекам FN3 с вогнутыми сайтами связывания, образованными wybranymi бета-тяжами и петлями.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Моноклональные антитела представляют собой наиболее широко применяемый класс терапевтических белков, когда желательны высокая аффинность и специфичность к молекуле-мишени. Однако не являющиеся антителами белки с относительно определенными трехмерными структурами, которые можно сконструировать для связывания желаемых молекул-мишеней, обычно называемые белковыми каркасами, могут иметь преимущества над традиционными антителами благодаря их малому размеру, отсутствию дисульфидных связей, высокой стабильности и возможности экспрессии в прокариотических хозяевах. Как правило, эти каркасы содержат одну или более областей, которые восприимчивы к конкретному или случайному изменению последовательности. Зачастую такую рандомизацию последовательности проводят для получения библиотек белков, из которых можно выбрать желаемые продукты. Для этого используют новые способы очистки. Каркасы легко конъюгируются с лекарственными средствами/токсинами, эффективно проникают в ткани и могут быть преобразованы в мультиспецифические связывающие агенты (Binz and Pluckthun, Curr Opin Biotechnol, 16, 459-469, 2005, Skerra, J Mol Recognit, 13, 167-187, 2000 г.).

Одним таким белковым каркасом является выявленный во множестве белков фибронектиновый домен типа III (FN3) с характерной третичной структурой с 6 петлями, соединенными 7 бета-тяжами. Три петли, а конкретно FG, BC и DE, структурно

аналогичны участкам, определяющим комплементарность (CDR), антител. Эти петли были рандомизированы для создания библиотек каркасов домена FN3 для успешного выбора специфически связывающихся с множеством различных мишеней агентов с сохранением важных биофизических свойств (Getmanova et al., Chem Biol, 13, 549-556, 2006 г., Hackel et al., J Mol Biol, 381, 1238-1252, 2008 г., Karatan et al., Chem Biol, 11, 835-844, 2004 г.; Koide et al., J Mol Biol, 284, 1141-1151, 1998 г.; Koide et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 6632-6637, 2007 г.; Parker et al., Protein Eng Des Sel, 18, 435-444, 2005 г.; Xu et al., Chemistry & Biology, 9, 933-942, 2002 г.). Библиотеки доменов FN3 также были созданы путем рандомизации петель АВ, ЕF и CD (публикация патента США № 2011/0038866; публикация международного патента № WO2011/05133; публикация патента США № 2011/0124527). Другие ссылки на библиотеки FN3 включают в себя публикации международных патентов №№ WO2002/32925, WO2003/104418, WO2009/023184 и WO2010/060095. В публикации международного патента № WO2012/016245 описаны библиотеки домена FN3 с применением петель CD и FG вместе с открытыми на поверхности остатками бета-листа.

Преимуществом было бы получение улучшенных каркасных белков на основе фибронектинового домена как для терапевтических, так и для диагностических целей. В настоящем описании представлены такие улучшенные белки.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ получения библиотеки доменов фибронектинового модуля типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, образованной бета-тяжем C, петель CD, бета-тяжем F и петель FG, содержащий обеспечение эталонного полипептида домена FN3 с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 27; внесение разнообразия в эталонный полипептид домена FN3 путем мутации по меньшей мере одного остатка бета-тяжа C и по меньшей мере одного остатка бета-тяжа F для образования библиотеки домена FN3 с диверсифицированной альтернативной

поверхностью C-CD-F-FG.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой библиотеку, формируемую способами настоящего изобретения, описанными в настоящем документе.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения белкового каркаса, содержащего домен фибронектинового модуля типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативой C-CD-F-FG, которая специфически связывается с молекулой-мишенью, содержащий приведение в контакт или пэннинг библиотеки по п. 11 с молекулой-мишенью и выделение белкового каркаса, который специфически связывается с молекулой-мишенью с заданной аффинностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показаны ленточные диаграммы структур домена FN3 и домена VN антитела. На фигуре отмечены петли домена FN3, структурно аналогичные CDR.

На фиг. 2 показаны структурные диаграммы, позволяющие сравнить А) традиционные библиотеки FN3 с рандомизированными петлями (фиг. 2А); В) библиотеку FN3 с рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG (библиотека TCL14) (фиг. 2В); С) библиотеку FN3 с рандомизированной поверхностью A-AB-B-BC-E (библиотека TCL15) (фиг. 2С). Рандомизированные положения в этих конфигурациях библиотеки показаны на ленточных диаграммах сплошной черной линией.

На фиг. 3 показано выравнивание последовательности каркаса Tencon27 (SEQ ID NO: 27) и библиотеки TCL14 (SEQ ID NO: 28) с рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG. Остатки петли помещены в рамку. Конкретные области петли и бета-тяжа указаны над последовательностями.

На фиг. 4 показано выравнивание последовательности каркаса Tencon27 (SEQ ID NO: 27) и библиотеки TCL15 с рандомизированной альтернативной поверхностью A-AB-B-BC-E (SEQ ID NO: 61). Остатки петли помещены в рамки. Конкретные области петли и бета-тяжа указаны над последовательностями.

На фиг. 5 показана топологическая диаграмма конфигурации библиотеки на основе Tencon27 (SEQ ID NO: 27) с

рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG (библиотека TCN14). Бета-тяжи показаны стрелками, причем остатки тяжей, связанные друг с другом водородными связями в структуре Tencon27, на диаграмме размещены смежно. Положения рандомизированных остатков показаны овалами с серой заливкой.

На фиг. 6 показана топологическая диаграмма конфигурации библиотеки на основе Tencon27 (SEQ ID NO: 27) с рандомизированной альтернативной поверхностью A-AB-B-BC-E (библиотека TCL15). Бета-тяжи показаны стрелками, причем остатки тяжей, связанные друг с другом водородными связями в структуре Tencon, на диаграмме размещены смежно. Положения рандомизированных остатков показаны овалами с серой заливкой.

На фиг. 7 показаны ожидаемые и наблюдаемые распределения аминокислот в рандомизированных положениях в библиотеке TCL14.

На фиг. 8 показано выравнивание Tencon27, TCL14 и разработанных библиотек на основе FN10, TN3 и Fibcon с рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG. Нумерация остатков основана на последовательности Tencon27. Аминокислотные последовательности библиотек показаны в SEQ ID NO: 28, 98, 99 и 62 соответственно. Остатки петли помещены в рамку. Конкретные области петли и бета-тяжа указаны над последовательностями.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

При применении в настоящем документе термин «домен фибронектинового модуля типа III (FN3)» или «домен FN3» относится к домену, часто встречающемуся в белках, включая фибронектины, тенасцин, белки внутриклеточного цитоскелета, цитокиновые рецепторы и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89, 8990-8994, 1992 г.; Meinke et al., J Bacteriol 175, 1910-1918, 1993 г.; Watanabe et al., J Biol Chem 265, 15659-15665, 1990 г.). Примерами доменов (или модулей) FN3 являются 15 различных доменов FN3, присутствующих в тенасцине С человека, и 15 различных доменов FN3, присутствующих в фибронектине человека (FN). Отдельные домены FN3 называют по номеру домена и названию белка, например, 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина

(FN10).

При применении в настоящем документе термин «эталонный домен FN3» относится к домену FN3 дикого типа или не встречающемуся в естественных условиях домену FN3, применяемому в качестве шаблона, в котором выполняются замены для создания белковых каркасов, специфически связывающихся с молекулой-мишенью.

Применяемый в настоящем документе термин «альтернативная поверхность» относится к поверхности на стороне домена FN3, содержащей два или более бета-тяжа и по меньшей мере одну петлю. Примерами альтернативных поверхностей являются поверхность C-CD-F-FG, образованная аминокислотами в бета-тяжах C и F и петлях CD и FG, и поверхность A-AB-B-BC-E, образованная аминокислотами в бета-тяжах A, B и E и петле BC.

Применяемый в настоящем документе термин «замена», «замещенный», «мутация» или «мутированный» относится к изменению, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательности полипептида или полинуклеотида для создания варианта этой последовательности.

Применяемый в настоящем документе термин «рандомизация», «рандомизированный», «диверсифицированный» или «диверсификация» относится к выполнению по меньшей мере одной замены, вставки или делеции в последовательности полинуклеотида или полипептида.

Применяемый в настоящем документе термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например, заменами, вставками или делециями.

Применяемый в настоящем документе термин «специфически связывается» или «специфическое связывание» относится к способности домена FN3 настоящего изобретения связываться с молекулой-мишенью с аффинностью (K_d) по меньшей мере 1×10^{-6} М и/или связываться с молекулой-мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере десятикратно превышает его аффинность к

неспецифическому антигену (например, БСА или казеину) по результатам измерения с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса.

Применяемый в настоящем документе термин «молекула-мишень» относится к белку, пептиду, углеводу, липиду и т.п. с антигеном или эпитопом, которые распознаются доменом FN3 настоящего изобретения. Молекула-мишень может встречаться в естественных условиях или не встречаться в естественных условиях.

Применяемый в настоящем документе термин «библиотека» относится к группе вариантов. Библиотека может состоять из вариантов полипептида или полинуклеотида.

Применяемый в настоящем документе термин «тенасцин С» относится к тенасцину С человека с последовательностью, показанной в GenBank под номером NP_002151 или в SEQ ID NO: 57. Тенасцин С имеет 15 tandemных доменов FN3, которые имеют аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 1-15 соответственно. Аминокислотная последовательность 3-го домена FN3 тенасцина С (TN3) показана в SEQ ID NO: 3.

Применяемый в настоящем документе термин «стабильность» относится к способности молекулы сохранять свернутое состояние в физиологических условиях, так что она сохраняет по меньшей мере одну из ее нормальных функциональных возможностей, например, способность связываться с молекулой-мишенью.

В настоящем изобретении предложены домены FN3, которые специфически связываются с молекулой-мишенью и, таким образом, могут широко применяться в терапевтических и диагностических целях. Настоящее изобретение основано на открытии того, что альтернативную поверхность на стороне домена FN3, содержащую два или более бета-тяжа и по меньшей мере одну петлю, можно рандомизировать для создания и выбора белковых каркасов, специфически связывающихся с молекулой-мишенью с высокой аффинностью. Опубликованные библиотеки на основе домена FN3 были созданы путем диверсификации либо верхних, либо нижних петель, областей, которые структурно аналогичны CDR в переменных цепях антитела, с обеспечением изогнутых поверхностей связывания. В настоящем изобретении молекулы с

высокой аффинностью связывания выбирают из библиотек доменов FN3, отображающих вогнутые поверхности взаимодействия, созданные путем рандомизации альтернативной поверхности, таким образом, вероятно, увеличивая число эпитопов и мишеней, для которых можно выбрать белковые каркасы с высокой аффинностью связывания. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие белковые домены, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, а также способы их получения и применения. В настоящем изобретении предложены способы получения библиотек доменов FN3, а также библиотеки, полученные способами настоящего изобретения.

Фибронектиновый домен типа III

Фибронектиновый домен (или модуль) типа III (FN3) представляет собой прототипный домен с повторами, исходно выявленный в фибронектине и в настоящее время известный в различных семействах белков животных, включая рецепторы клеточной поверхности, белки внеклеточного матрикса, ферменты и мышечные белки. Структурно домены FN3 имеют топологию, в большой степени аналогичную иммуноглобулинподобным доменам, за исключением отсутствия дисульфидных связей. Как известно специалистам в данной области, встречающиеся в естественных условиях домены FN3 имеют структуру типа бета-сэндвича с семью бета-тяжами, обозначаемыми A, B, C, D, E, F и G, связанными шестью петлями, обозначаемыми AB, BC, CD, DE, EF и FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89, 8990-8992, 1992 г.; патент США № 6673901). Три петли BC, DE и FG находятся в верхней части домена FN3, а три петли AB, CD и EF — в нижней части домена (фиг. 1). В таблице 1 показаны несколько содержащих домен FN3 белков и число различных доменов FN3, связанных с каждым белком. Хотя конформации домена FN3 высококонсервативны, сходство между различными доменами на уровне аминокислот достаточно низка.

Домены FN3 могут встречаться в естественных условиях или могут не встречаться в естественных условиях. Примером не встречающихся в естественных условиях доменов FN3 является консенсусный домен FN3, разработанный на основе выравнивания

выбранных доменов FN3, присутствующих в определенной белке, и включающий наиболее консервативную (часто встречающуюся) аминокислоту в каждом положении для создания не встречающегося в естественных условиях домена FN3. Например, не встречающийся в естественных условиях домен FN3 разработан на основе консенсусной последовательности 15 доменов FN3 тенасцина С человека или на основе консенсусной последовательности 15 доменов FN3 фибронектина человека. Эти не встречающиеся в естественных условиях домены FN3 сохраняют типичную топологию доменов FN3 и могут показывать улучшенные свойства, такие как улучшенная стабильность, в сравнении с доменами FN3 дикого типа. Примерами не встречающихся в естественных условиях доменов FN3 являются домены Tencon и Fibcon, показанные в SEQ ID NO: 16 и 58, соответственно, и описанные в публикации патента США № 2010/0216708 и публикации патента США № 2010/0255056.

Таблица 1

Белок FN3	Число доменов FN3
Рецептор ангиопоэтина 1	3
Белок контактин	4
Общая β -цепь цитокинового рецептора	2
Белок клеточной адгезии синдрома Дауна	6
Белок Sevenless дрозофилы	7
Рецептор эритропоэтина	1
Фибронектин	15
Рецептор соматотропина	1
Рецептор инсулина	2
Рецептор инсулиноподобного фактора роста I	3
β -цепь рецептора интерферона- γ	2
β -цепь интерлейкина-12	1
β -цепь рецептора интерлейкина-2	1
Рецептор лептина (LEP-R)	3
Рецептор фактора, ингибирующего лейкоз	6
Общий антиген лейкоцитов	2
Белок адгезии нервной клетки L1	4
Рецептор пролактина	2
Белок тенасцин	15
Рецептор тромбопоэтина	2
Рецептор тирозинпротеинкиназы Tie-1	3

В таблице 2 показаны аминокислотные остатки, образующие

каждую петлю и каждый бета-тяж для каркаса FN3 Tencon27 (SEQ ID NO: 27). Положения каждой петли и бета-тяжа в 3-м домене FN3 тенащина С (TN3) (SEQ ID NO: 3) и в Fibcon (SEQ ID NO: 58) идентичны Tencon27. Остатки бета-тяжей можно выявить путем применения хорошо известных способов, например, путем анализа трехмерных структур, созданных с помощью рентгеновской дифракции, ядерного магнитного резонанса или молекулярного моделирования. Когда модели недоступны, для прогнозирования границ областей тяжа и петли можно применять анализ выравниваний последовательности с другими известными молекулами FN3. Наконец, можно применять компьютерные алгоритмы для прогнозирования наличия бета-тяжей из первичных последовательностей белка.

Таблица 2

Домен FN3	Tencon27 (SEQ ID NO: 27)
Тяж А	1-12
Петля АВ	13-16
Тяж В	17-21
Петля ВС	22-28
Тяж С	29-37
Петля CD	38-43
Тяж D	44-50
Петля DE	51-54
Тяж E	55-59
Петля EF	60-64
Тяж F	65-74
Петля FG	75-81
Тяж G	82-89

Альтернативные поверхности на доменах FN3

Верхние (BC, DE и FG) и нижние (AB, CD и EF) петли, например, отмеченные поверхности связывания в доменах FN3, разделены бета-тяжами, которые образуют центр структуры домена FN3 (фиг. 1, 2A). Альтернативные поверхности, находящиеся с двух «сторон» доменов FN3 с формами, отличными от поверхностей, образованных петлями, можно визуализировать только путем вращения структуры домена FN3 на 90 градусов (фиг. 2B, 2C). С одной стороны домена FN3 с помощью двух антипараллельных бета-тяжей — бета-тяжей С и F и петель CD и FG — образована несколько вогнутая поверхность, и в настоящем документе она

называется поверхностью C-CD-F-FG. Альтернативная поверхность также образована с противоположной стороны поверхности C-CD-F-FG с помощью бета-тяжей А, В и Е и петель АВ и ВС, и в настоящем документе называется поверхностью А-АВ-В-ВС-Е.

Альтернативные поверхности в доменах FN3 в каждом домене FN3 кодируются несмежными фрагментами аминокислот. Например, как показано в таблице 2, поверхность C-CD-F-FG в Tencon27 образована аминокислотными остатками 29-43 и 65-81 SEQ ID NO: 27, а поверхность А-АВ-В-ВС-Е Tencon27 образована аминокислотными остатками 1-28 и 55-59 SEQ ID NO: 27.

Белковые каркасы на основе рандомизации альтернативных поверхностей

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный белковый каркас, содержащий домен FN3, содержащий альтернативную поверхность, причем альтернативная поверхность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в каждом бета-тяже и каждой петле, образующих альтернативную поверхность, в сравнении с эталонным доменом FN3.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения специфически связывается с молекулой-мишенью, не связанной специфически эталонным доменом FN3.

В другом варианте осуществления эталонный домен FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения содержит альтернативную поверхность C-CD-F-FG, образованную бета-тяжем С, петлей CD, бета-тяжем F и петлей FG.

В другом варианте осуществления бета-тяж С, петля CD, бета-тяж F или петля FG, образующие альтернативную поверхность C-CD-F-FG, содержат определенные аминокислотные последовательности, как показано в таблицах 4 и 5 и в SEQ ID NO: 45-48.

В другом варианте осуществления бета-тяж С содержит аминокислотную последовательность DSFLIQYQE (SEQ ID NO: 33) с заменами по 1, 2, 3 или 4 остаткам, бета-тяж F содержит аминокислотную последовательность TEYTVSIYGV (SEQ ID NO: 39) с

заменами по 1, 2, 3, 4 или 5 остаткам, бета-тяж С и петля CD содержат аминокислотную последовательность DSFLIQYQESEKVGЕ (SEQ ID NO: 42) с заменами по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остаткам, или бета-тяж F и петля FG содержат аминокислотную последовательность TEYTVSIYGVKGGHRSN (SEQ ID NO: 43) с заменами по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 остаткам.

В другом варианте осуществления бета-тяж С и бета-тяж F содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 67% идентичную SEQ ID NO:33 и по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO:39, соответственно, бета-тяж С и петля CD содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 53% идентичную SEQ ID NO: 42, или бета-тяж F и петля FG содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 65% идентичную SEQ ID NO: 43.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения содержит домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 28.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения содержит домен фибронектинового модуля типа III (FN3), содержащий:

бета-тяж А, петлю АВ, бета-тяж В, петлю ВС, бета-тяж D, петлю DE, бета-тяж Е, петлю EF и бета-тяж G с аминокислотными последовательностями, идентичными SEQ ID NO: 27 по остаткам 1-12, 13-16, 17-21, 22-28, 44-50, 51-54, 55-59, 60-64 и 82-89 соответственно;

бета-тяж С и петлю CD с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 53% идентичной SEQ ID NO: 42; и

бета-тяж F и петлю FG с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 65% идентичной SEQ ID NO: 43, необязательно имеющие по меньшей мере одну замену в положениях аминокислот, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 в SEQ ID NO: 27, причем белковый каркас специфически связывается с молекулой-мишенью, не связанной специфически эталонным доменом FN3.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего

изобретения содержит домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотным последовательностям, показанным в SEQ ID NO: 27.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения содержит альтернативную поверхность А-АВ-В-ВС-Е, образованную бета-тяжем А, петлей АВ, бета-тяжем В, петлей ВС и бета-тяжем Е.

В другом варианте осуществления бета-тяж А, петля АВ, бета-тяж В и петля ВС, образующие альтернативную поверхность А-АВ-В-ВС-Е, содержат определенные аминокислотные последовательности, как показано в таблицах 4 и 5 и в SEQ ID NO: 49 и 50.

В другом варианте осуществления бета-тяж А, петля АВ, бета-тяж В и петля ВС содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 59% идентичную SEQ ID NO: 44, а бета-тяж Е содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60% идентичную SEQ ID NO: 37.

В другом варианте осуществления белковый каркас настоящего изобретения содержит домен FN3, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 61.

В другом варианте осуществления выделенный белковый каркас настоящего изобретения содержит домен FN3, содержащий:

бета-тяж С, петлю CD, бета-тяж D, петлю DE, петлю EF, бета-тяж F, петлю FG и бета-тяж G с аминокислотными последовательностями, идентичными SEQ ID NO: 27 по остаткам 29-37, 38-43, 44-50, 51-54, 60-64, 65-74, 75-81 и 82-89 соответственно;

бета-тяж А, петлю АВ, бета-тяж В и петлю ВС с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 59% идентичными SEQ ID NO: 44; и

бета-тяж Е с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 60% идентичной SEQ ID NO: 37, необязательно содержащий по меньшей мере одну замену в положениях аминокислот, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 в SEQ ID NO: 27, причем белковый каркас

специфически связывается с молекулой-мишенью, не связанной специфически эталонным доменом FN3.

Домены FN3, специфически связывающиеся с молекулой-мишенью, можно создавать путем рандомизации подмножества остатков, образующих альтернативную поверхность. Например, можно рандомизировать по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять остатков в каждом бета-тяже и в каждой петле, участвующих в альтернативной поверхности. Для повышения разнообразия библиотеки можно рандомизировать дополнительные остатки. Например, можно рандомизировать 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% остатков в каждом бета-тяже и в каждой петле, образующих альтернативную поверхность. Альтернативно домены FN3, специфически связывающиеся с молекулой-мишенью, можно создавать путем рандомизации подмножества остатков бета-тяжей, участвующих в альтернативной поверхности, без рандомизации любых петель. Например, можно рандомизировать по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять остатков в каждом бета-тяже, участвующем в альтернативной поверхности. Для повышения разнообразия библиотеки можно рандомизировать дополнительные остатки, находящиеся в бета-тяжах. Например, можно рандомизировать 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% остатков в каждом бета-тяже, образующем альтернативную поверхность.

Бета-тяжи имеют повторяющуюся структуру, причем боковая цепь каждого второго остатка открыта на поверхности белка. Открытые на поверхности боковые цепи определяют путем изучения трехмерных структур или путем сравнения последовательностей доменов FN3 с известной структурой, используя множественное выравнивание последовательности. Для рандомизации можно выбрать все или подмножество открытых на поверхности остатков бета-тяжей, участвующих в альтернативной поверхности. Например, альтернативная поверхность C-CD-F-FG Tencon27 (SEQ ID NO: 27) имеет четыре открытых на поверхности остатка в бета-тяже C (S30, L32, Q34 и Q36) и пять открытых на поверхности остатков в бета-тяже F (E66, T68, S70, Y72 и V74), нумерация остатков

основана на SEQ ID NO: 27. Один или более из этих остатков можно рандомизировать для создания библиотеки. Остатки у точки соединения альтернативной поверхности, такие как S30, E66 и V74, могут быть или не быть рандомизированы. Рандомизация внутренних остатков бета-тяжей может привести к дестабилизации каркаса вследствие потери гидрофобных контактов в ядре структуры. Внутренние остатки можно рандомизировать так, чтобы применять только подмножество аминокислот, например, только гидрофобные аминокислоты.

Можно рандомизировать подмножество или все остатки в областях петли, участвующей в альтернативной поверхности. Например, можно выполнить замены в 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 положениях в петлях CD и/или FG, участвующих в альтернативной поверхности. Остатки глицина в петлях, такие как G42, G76 и/или G77 в Tencon27, могут обеспечивать гибкость и могут быть или не быть рандомизированы. Остатки у границ бета-тяжа/петли, такие как E43 в Tencon27, могут быть или не быть рандомизированы. В рандомизацию также можно включить или из рандомизации можно исключить дополнительные остатки в областях бета-тяжа или петли. Например, остатки, которые на основе, например, анализа кристаллических структур доменов FN3, по-видимому, необходимы для стабилизации, могут быть или не быть рандомизированы. Например, S80 в Tencon27 находится в контакте с ядром домена FN3, чтобы потенциально стабилизировать петлю FG, а K75 частично обращен от альтернативной поверхности. Таким образом, оба эти остатка можно исключить из исходной конфигурации библиотеки. В примере библиотеки доменов FN3 с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG, остатки, которые могут быть рандомизированы, включают в себя остатки в положениях 30, 32, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 или 81 SEQ ID NO: 27. В примере библиотеки доменов FN3 с рандомизированной поверхностью A-AB-B-BC-E, остатки, которые могут быть рандомизированы, включают в себя остатки в положениях 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 55 и 57.

Разнообразие в петлях, участвующих в альтернативных поверхностях, можно достичь путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, петли FG и/или CD можно расширить на 1–22 аминокислоты или уменьшить на 1–3 аминокислоты. Петля FG в Tencon27 имеет длину в 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антитела находится в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петли, участвующие в альтернативных поверхностях, например, петли FG, можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела в 4–28 остатков.

Полученные домены FN3, специфически связывающиеся с молекулой-мишенью, можно дополнительно модифицировать по остаткам, находящимся за пределами или в пределах альтернативной поверхности, для целей, например, улучшения стабильности, снижения иммуногенности, увеличения аффинности связывания, скорости ассоциации, скорости диссоциации, периода полужизни, растворимости или любых других подходящих характеристик. В одном способе достижения данной цели каркасные белки можно необязательно получить с помощью процесса анализа родительских последовательностей и различных концептуальных сконструированных продуктов с применением трехмерных моделей родительских и сконструированных последовательностей. Трехмерные модели широкодоступны и известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, иллюстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей и способные измерять возможную иммуногенность (например, программа Immunofilter, разработанная Xencor, Inc., г. Монровия, штат Калифорния, США). Изучение этих отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании потенциальной последовательности, например, остатков, влияющих на стабильность белкового каркаса или способность потенциального каркасного белка связываться с его молекулой-мишенью. Таким образом, возможны выбор и комбинирование остатков из родительской и эталонной последовательностей так,

чтобы достичь желаемых характеристик, таких как улучшенная стабильность каркаса. Альтернативно или в дополнение к вышеописанным процедурам можно применять другие подходящие способы конструирования, известные специалистам в данной области.

Желаемые физические свойства доменов FN3 настоящего изобретения включают в себя высокую термостабильность и обратимость термического сворачивания и разворачивания. Для повышения очевидной термостабильности белков и ферментов использовали несколько способов, включая рациональную конфигурацию, основанную на сравнении с термостабильными последовательностями с высокой степенью сходства, конфигурацию стабилизирующих дисульфидных мостиков, мутации для повышения склонности к образованию альфа-спирали, конструирование солевых мостиков, изменение поверхностного заряда белка, направленную эволюцию и композицию консенсусных последовательностей (Lehmann and Wyss, *Curr Opin Biotechnol*, 12, 371-375, 2001 г.). Высокая термостабильность может повышать выход экспрессируемого белка, повышать растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии для производства.

Остатки, которые можно заменить для улучшения любых характеристик доменов FN3 настоящего изобретения, можно определить путем выполнения замены и анализа желаемых характеристик каркаса. Примеры каркаса на основе домена FN3 с улучшенными характеристиками включают каркас Tencon (SEQ ID NO: 16) или каркас Tencon27 (SEQ ID NO: 27), модифицированный по одному или более положениям аминокислотных остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86.

В отношении потери стабильности, т. е. «денатурирование» или «денатурация» белка означают процесс, в котором происходит потеря части или всей трехмерной конформации, обеспечивающей потерю функциональных свойств белка с соответствующей потерей активности и/или растворимости. Разрушаемые при денатурации силы включают в себя внутримолекулярные связи, например, электростатические, гидрофобные, Ван-дер-Ваальсовы силы, водородные связи и дисульфиды. Денатурацию белка можно вызвать

путем приложения к белку или содержащему белок раствору сил, таких как механическое воздействие (например, компрессионное или сдвиговое усилие), тепловой, осмотический стресс, изменение pH, электрические или магнитные поля, ионизирующее излучение, ультрафиолетовое излучение и дегидратация, а также путем воздействия химических денатурирующих веществ.

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один и тот же или как различные аспекты целостности белка. Белки чувствительны или «лабильны» к денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменением осмолярности и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-облучение, химической или тепловой дегидратацией или любым другим действием или силой, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с применением стандартных способов. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления (ТМ) — температуры в градусах Цельсия ($^{\circ}\text{C}$), при которой $\frac{1}{2}$ молекул разворачиваются, применяя стандартные способы. Как правило, чем выше ТМ, тем более стабильна молекула. В дополнение к нагреву способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также определяется химической средой.

В одном варианте осуществления домены FN3 настоящего изобретения показывают стабильность, повышенную по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более по сравнению с тем же доменом до конструирования, что измеряется по повышению ТМ.

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. Химические денатурирующие вещества включают в себя гидрохлорид гуанидиния, тиоцианат гуанидиния, мочевины, ацетон, органические растворители (ДМФ, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид

лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротиобензол, а также гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные моющие средства, кислоты (например, соляная кислота (HCl), уксусная кислота (CH₃COOH), галогензамещенные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды), а также направленные денатурирующие агенты. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам либо разрушение или образование дисульфидных связей.

В одном варианте осуществления каркасы настоящего изобретения показывают стабильность, повышенную по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более в сравнении с тем же каркасом до конструирования, что измеряется путем применения гидрохлорида гуанидиния в качестве химического денатурирующего вещества. Повышение стабильности можно измерять в зависимости от снижения флуоресценции триптофана при обработке повышающимися концентрациями гидрохлорида гуанидиния, применяя хорошо известные способы.

Специфически связывающиеся с молекулой-мишенью домены FN3 настоящего изобретения можно создавать, применяя в качестве шаблона любой домен FN3 для замен в соответствии со способами, представленными в настоящем документе. Примерами доменов FN3 с рандомизированными альтернативными поверхностями являются 3-й домен FN3 тенасцина С (TN3) (SEQ ID NO: 3), Tencon (SEQ ID NO: 16), Tencon27 (SEQ ID NO: 27), Fibcon (SEQ ID NO: 58) и 10-й домен FN3 фибронектина (FN10) (SEQ ID NO: 97). Положения аминокислот, обрисовывающих альтернативные поверхности в Tencon27, показаны в таблице 2 и на фиг. 8 и идентичны линейной последовательности Tencon, TN3 и Fibcon. Положения аминокислот, обрисовывающих альтернативную поверхность в FN10, показаны на фиг. 8. Остатки, образующие альтернативные поверхности в других

доменах FN3, можно выявить путем изучения трехмерных структур (при наличии) или путем анализа выравниваний последовательностей доменов FN3 с помощью хорошо известных способов.

Домены FN3 настоящего изобретения могут быть созданы в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, таким образом, avidности к связыванию молекулы-мишени или для создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более различные молекулы-мишени. Димеры и мультимеры могут быть созданы путем связывания моноспецифических, би- или мультиспецифических белковых каркасов, например, путем включения аминокислотного линкера, например, линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Применение встречающихся в естественных условиях, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитые полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989 г.; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995 г.; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996 г.; патент США № 5856456).

Домены FN3 настоящего изобретения можно применять как биспецифические молекулы, причем первая альтернативная поверхность в домене имеет специфичность к первой молекуле-мишени, а вторая альтернативная поверхность в том же домене имеет специфичность ко второй молекуле-мишени. Примером биспецифического белкового домена является вариант Tencon27, который связывает первую молекулу-мишень на поверхности C-CD-F-FG и вторую молекулу-мишень на поверхности A-AB-B-BC-E.

Домены FN3 настоящего изобретения могут включать другие субъединицы, например, с помощью ковалентного взаимодействия. К домену FN3 можно прикрепить весь или часть константного участка антитела для придания антителоподобных свойств, в особенности тех свойств, которые связаны с участком Fc, например, комплементарная активность, период полужизни и т.п. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание рецептора

Fc, антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток; BCR) и т.д., можно обеспечить и/или контролировать путем модификации остатков в Fc, ответственном за такую активность (в качестве обзора; см. Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685-691, 2009 г.).

В домены FN3 настоящего изобретения можно встроить дополнительные фрагменты, такие как конъюгаты токсинов, альбумин или связывающиеся с альбумином агенты, молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20 000, жирные кислоты и эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например, лаурат, миристан, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандионовую кислоту, тетрадекандионовую кислоту, октадекандионовую кислоту, докозандионовую кислоту и т.п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно создавать стандартными методиками клонирования и экспрессии. Альтернативно для прикрепления фрагментов в сформированные рекомбинантным способом домены FN3 настоящего изобретения можно применять хорошо известные способы химического связывания.

Домены FN3 со встроенными дополнительными фрагментами можно сравнить по функциональности с помощью нескольких хорошо известных анализов. Например, изменение свойств домена FN3 вследствие встраивания доменов Fc и/или вариантов домена Fc можно проанализировать в анализах связывания с рецепторами Fc, применяя растворимые формы рецепторов, такие как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или применяя хорошо известные клеточные анализы для измерения, например, ADCC или CDC, или оценки фармакокинетических свойств белкового каркаса на моделях *in vivo*.

Создание и получение белков домена FN3

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ получения библиотеки доменов FN3,

содержащей альтернативную поверхность, причем альтернативная поверхность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в сравнении с эталонным доменом FN3, содержащий: обеспечение полинуклеотида, кодирующего эталонный домен FN3; создание библиотеки полинуклеотидных последовательностей эталонного домена FN3 путем рандомизации альтернативной поверхности; трансляцию библиотеки *in vitro* или экспрессию библиотеки в хозяине.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ получения библиотеки доменов FN3 с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, образованной бета-тяжем C, петлей CD, бета-тяжем F и петлей FG, содержащий обеспечение эталонного полипептида домена FN3 с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 27; внесение разнообразия в эталонный полипептид домена FN3 путем мутации по меньшей мере одного остатка бета-тяжа C и по меньшей мере одного остатка бета-тяжа F для образования библиотеки домена FN3 с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG.

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка в бета-тяже C, при условии, что S30 не мутирован (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы остатки L32, Q34 и Q36 бета-тяжа C (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка в бета-тяже F при условии, что E66 не мутирован (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы остатки T68, S70 и Y72 бета-тяжа F (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка в петле CD при условии, что остатки G42 и E43 не мутированы (нумерация

остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы остатки S38, E39, K40 и V41 в петле CD.

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка в петле FG, при условии что остатки K75, G76, G77 и S80 не мутированы (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения могут быть мутированы остатки H78, R79 и N81 петли FG (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27).

В способах получения библиотеки настоящего изобретения эталонный домен FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, необязательно содержащую по меньшей мере одну замену в положениях аминокислот 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86.

В способах настоящего изобретения можно применять другие эталонные домены FN3, такие как Tencon (SEQ ID NO: 16) или его варианты, как показано в SEQ ID NO: 17-26 и в таблице 3.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой библиотеку, формируемую способами настоящего изобретения.

Создание каркасных белков, доменов (или модулей) FN3 настоящего изобретения, как правило, достигают на уровне нуклеиновых кислот. Библиотеки доменов FN3 настоящего изобретения, имеющие замещенные кодоны в одном или более конкретных остатках, можно синтезировать, например, с применением стандартных способов клонирования с помощью ПЦР или химического синтеза генов в соответствии со способами, описанными в патенте США № 6521427 и патенте США № 6670127. Кодоны можно рандомизировать с применением хорошо известных способов, например, вырожденных олигонуклеотидов, соответствующих разработанному разнообразию, или с применением мутагенеза по Кункелю (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154, 367-382, 1987 г.).

Библиотеки можно рандомизировать по выбранным кодонам с применением случайного или определенного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющей случайные замены, можно

создавать с применением кодонов NNK, которые кодируют все 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот. В других схемах диверсификации можно применять кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно можно применять кодоны NNS для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Как и любые другие белки, домены FN3 настоящего изобретения склонны к множеству физических и/или химических нестабильностей, приводящих к отрицательным эффектам при дальнейшей обработке. Например, физическая и химическая нестабильность может приводить к агрегации, деградации, снижению выхода продукта, потере эффективности, повышению иммуногенного потенциала, молекулярной неоднородности и потере активности. Таким образом, в процессе разработки библиотек можно минимизировать наличие возможных индуцирующих нестабильность остатков и распознаваемых последовательностей. Например, открытые на поверхности метионин и триптофан могут окисляться в условиях хранения, что может приводить к потере эффективности белкового каркаса. Наличие аспарагина, в дополнение к участию в хорошо известных сайтах распознавания N-гликозилирования (NXS/T), может быть дезаминировано при наличии идущего за ним глицина, что, возможно, создает гетерогенность (Robinson, Proc Natl Acad Sci USA, 99, 5283–5288, 2002 г.). Таким образом, некоторые или все из этих аминокислот можно исключить или не исключать из смеси, применяемой для рандомизации выбранного положения. Более того, можно исключить цистеин и пролин для минимизации образования дисульфидного мостика и разрушения бета-листов.

Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, путем применения технологии Slonomics® (http://www.sloning_com). В этой технологии применяют библиотеку предварительно приготовленных двухцепочечных триплетов, которые действуют как универсальные строительные

блоки, достаточные для тысяч процессов синтеза генов. В библиотеке триплетов представлены все возможные комбинации последовательностей, необходимые для построения желаемой молекулы ДНК.

Специалистам в данной области хорошо известен синтез олигонуклеотидов с выбранной «вырожденностью» нуклеотидов в определенных положениях, например, подход TRIM (Knappek et al., J Mol Biol 296, 57-86, 1999 г.; Garrard & Henner, Gene 128, 103-109, 1993 г.). Такие наборы нуклеотидов, имеющие определенные наборы кодонов, можно синтезировать с применением доступных в продаже нуклеотидных или нуклеозидных реагентов и устройства.

В примере схемы диверсификации остатки L32, Q34 и Q36 бета-тяжа С, S38, E39, K40 и V41 петли CD, T68, S70 и Y72 бета-тяжа F и H78, R79 и N81 в петле FG домена FN3 Tencon27 (SEQ ID NO: 27) рандомизируют кодонами NNS.

Применяют стандартные методики клонирования и экспрессии для клонирования библиотек в вектор или синтеза кассет с двухцепочечной кДНК библиотеки, чтобы затем экспрессировать библиотеки или транслировать их *in vitro*. Например, можно применять цис-дисплей для лигатирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментом ДНК, кодирующим RepA, чтобы создать пул комплексов белок-ДНК, образованных после трансляции *in vitro*, причем каждый белок стабильно ассоциируется с кодирующей его ДНК (патент США № 7,842,476; Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 2806-2810, 2004 г.). Можно применять другие способы, например, рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997 г.), мРНК-дисплей (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997 г.) или другие бесклеточные системы (патент США № 5643768). Библиотеки белковых каркасов можно экспрессировать как слитые белки, отображающиеся на поверхности, например, любого подходящего бактериофага. Способы отображения слитых полипептидов на поверхности бактериофага хорошо известны (публикация патента США № 2011/0118144; публикация международного патента № WO2009/085462; патент США №

6,969,108; патент США № 6,172,197; патент США № 5223409; патент США № 6582915; патент США № 6472147).

Скрининг

Скрининг сконструированных доменов FN3 белка или библиотек вариантов домена FN3 на специфическое связывание с молекулами-мишенями можно достигать, например, путем получения библиотеки с применением цис-дисплея, как описано в примерах и в работе Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806-2810, 2004 г., а также анализа библиотеки на специфическое связывание с молекулой-мишенью любым способом, известным специалистам в данной области. Примеры хорошо известных способов, которые можно применять, - это ИФА, иммуноферментный сэндвич-анализ и конкурентный и неконкурентный анализы (см., например, Ausubel et al., eds, 1994 г., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Домены FN3 настоящего изобретения могут связывать белки человека или других млекопитающих с широким диапазоном аффинности (K_D). Как правило, домен FN3 настоящего изобретения может связываться с белком-мишенью с K_D , равной или меньшей приблизительно 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М или 10^{-15} М, по результатам измерения с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса или способом Kineха, известным специалистам в данной области. Аффинность домена FN3 к антигену можно определить экспериментально с помощью любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984 г.); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992 г.); а также способы, описанные в настоящем документе). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре домен FN3-антиген может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например, K_D , K_{on} , K_{off}) предпочтительно производят с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена, а также стандартизированного буферного раствора, такого как

описанный в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

В настоящем изобретении предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие домены FN3 настоящего изобретения, в виде выделенных полинуклеотидов или в виде частей векторов экспрессии или в виде частей линейных последовательностей ДНК, включая линейные последовательности ДНК, применяемые для транскрипции/трансляции *in vitro*, векторов, совместимых с экспрессией, секрецией и/или отображением композиций или результатов их направленного мутагенеза в прокариотах, эукариотах или нитчатых фагах. В настоящем документе описаны некоторые примеры полинуклеотидов, однако другие полинуклеотиды, которые, учитывая вырожденность генетического кода или предпочтения в отношении кодона в данной системе экспрессии, кодируют белковые каркасы и библиотеки белковых каркасов настоящего изобретения, также находятся в объеме настоящего изобретения.

Полинуклеотиды настоящего изобретения можно сформировать путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез полинуклеотидов на автоматическом синтезаторе полинуклеотидов, и сборки в полные одно- или двухцепочечные молекулы. Альтернативно полинуклеотиды настоящего изобретения можно сформировать другими методами, такими как ПЦР с последующим стандартным клонированием. Методики производства или получения полинуклеотидов с заданной известной последовательностью хорошо известны специалистам в данной области.

Полинуклеотиды настоящего изобретения могут содержать по меньшей мере одну не кодирующую последовательность, такую как промоторную или энхансерную последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, цис-последовательность, облегчающую связывание с RepA, и т. п. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, которые кодируют, например, маркерную последовательность или последовательность метки, такую как гистидиновую метку или метку HA, для облегчения очистки или обнаружения белка, сигнальную последовательность, партнер для слитого белка, такой как RepA,

Fc или белок покрытия бактериофага, такой как pIX или pIII.

Пример нуклеотида содержит последовательности для промотора Tac, последовательности, кодирующие библиотеку доменов FN3 и repA, цис-элемент и бактериальную точку начала репликации (ori). Другой пример полинуклеотида содержит сигнальную последовательность pelB или ompA, белок покрытия бактериофага pIII pIX, домен FN3 и сайт polyA. Примеры полинуклеотидов, кодирующих библиотеку TCL14 и Tencon27, показаны в SEQ ID NO: 100 и 101 соответственно.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут быть плазмидными векторами, вирусными векторами, бакуловирусными экспрессионными векторами, векторами на основе транспозонов или любыми другими векторами, подходящими для внесения полинуклеотидов настоящего изобретения в заданный организм или генетическое окружение любыми средствами. Такие векторы могут представлять собой векторы экспрессии, содержащие элементы последовательности нуклеиновых кислот, которые могут контролировать, регулировать, вызывать или допускать экспрессию полипептидов, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут содержать сайты связывания энхансера транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, способствующие экспрессии закодированных полипептидов в данной экспрессионной системе. Такие экспрессионные системы могут быть клеточными или бесклеточными системами, хорошо известными специалистам в данной области.

Выбор клетки-хозяина или конструирование клетки-хозяина

Домен FN3 настоящего изобретения можно необязательно формировать с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно специалистам в данной области, см., например, публикации Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987–2001 г.); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor,

NY (1989 г.); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989 г.); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994–2001 г.); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001 г.).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может происходить от млекопитающего или может быть выбрана из клеток COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Нер G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых их производных, иммортализованных или трансформированных клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбрать из видов или организмов, неспособных к гликозилированию полипептидов, например, прокариотической клетки или организма, такого как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3) и любого из естественных или сконструированных штаммов *E. coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

Применение доменов FN3 настоящего изобретения

Композиции молекул домена (модуля) на основе FN3, описанные в настоящем документе и созданные любым из вышеописанных способов, можно применять для диагностики, мониторинга, модуляции, лечения, ослабления, профилактики развития или снижения симптомов заболевания человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, текучих сред или по существу хозяина. Сконструированный для конкретной цели домен FN3 можно применять для лечения иммуноопосредованного или иммунодефицитного заболевания, метаболического заболевания, сердечно-сосудистого расстройства или заболевания; злокачественного заболевания; неврологического расстройства или заболевания; инфекции, такой как бактериальная, вирусная или паразитарная инфекция; или другого известного или указанного связанного состояния, включая отек, боль и некроз или фиброз ткани.

Такой способ может содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один домен FN3, специфически связывающий молекулу-мишень с клеткой, тканью, органом,

животным или пациентом, которому необходимо такое модулирование, лечение, ослабление, профилактика или снижение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное количество может содержать количество от приблизительно 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсного), многократного или непрерывного введения, или достигать сывороточной концентрации 0,01–5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или может находиться в любом эффективном диапазоне или значении, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях.

Фармацевтические композиции, содержащие белки домена FN3

Домены FN3, специфически связывающие молекулы-мишени, которые модифицированы или не модифицированы, с мономерами, димерами или мультимерами, а также моно-, би- или мультиспецифические, можно выделить с применением хорошо известных специалистам в данной области процедур разделения для захвата, иммобилизации, разделения или осаждения и очистить до степени, которая необходима для возможности коммерческого применения.

Для терапевтического применения домены FN3, специфически связывающие молекулу-мишень, можно приготовить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена FN3 в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или среде, с которыми будет вводиться активное соединение. Такая среда может быть жидкой, такой как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4% физиологический раствор и 0,3% глицин. Эти растворы стерильны и по существу свободны от твердых частиц. Их стерилизацию могут проводить с использованием традиционных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые

вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, необходимые для регулирования и буферизации pH, стабилизаторы, загустители, смазывающие агенты и красители и т.д. Концентрация агента настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может изменяться в широких пределах, т.е. от менее чем приблизительно 0,5% (как правило, по меньшей мере приблизительно 1%) до 15–20% вес., и выбирается преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучих сред, вязкостей и т. д. в соответствии с конкретным выбранным режимом введения. Подходящие среды и составы, включая другие белки человека, например, сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing стр. 691–1092, см. в особенности стр. 958–989.

Режим введения для терапевтического применения доменов FN3, специфически связывающих молекулы-мишени, может представлять собой любой подходящий путь, обеспечивающий доставку агента в хозяина, такой как парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное, подкожное, легочное; чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное); с применением состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, гранул; и содержащиеся в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, очевидных для квалифицированного специалиста, которые хорошо известны в данной области. Можно обеспечить специфическое введение в область, например, в виде доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, простату, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, пузырь, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Хотя настоящее изобретение описано в общем виде, варианты осуществления настоящего изобретения будут дополнительно описаны в следующих примерах, которые не следует воспринимать как ограничивающие объем пунктов формулы изобретения.

ПРИМЕР 1. Каркас Tenson

Конфигурация Tenson

Третий домен фибронектинового модуля типа III (Fn3) тенасцина С человека (SEQ ID NO: 3) можно применять в качестве белкового каркаса, который можно сконструировать для связывания конкретных молекул-мишеней. Температура плавления этого домена в его нативной форме в ФСБ составляет 54°C.

Для получения белкового каркаса с аналогичной структурой и улучшенными физическими свойствами, такими как улучшенная термостабильность, разработали консенсусную последовательность на основе выравнивания 15 доменов FN3 тенасцина С человека (показаны в SEQ ID NO: 1-15). Выбранные 15 доменов FN3 имеют степени идентичности последовательностей друг с другом в диапазоне от 13 до 80% со средней степенью идентичности последовательностей между парами, равной 29%. Консенсусную последовательность, обозначенную как Tenson (SEQ ID NO: 16), разработали путем включения наиболее консервативных (часто встречающихся) аминокислот в каждом положении (см. публикацию патента США № 2010/0216708). В попарных выравниваниях Tenson идентична доменам FN3 тенасцина С в 34-59% положений, причем средняя степень идентичности последовательности составляет 43%.

Экспрессия и очистка Tenson

Провели обратную трансляцию аминокислотной последовательности Tenson, получив последовательность кДНК, показанную в SEQ ID NO: 59. Полученную кДНК амплифицировали и клонировали в модифицированный вектор pET15 с применением стандартных способов. Белок экспрессировали как слитый белок с His₆ на С-конце в растворимой форме в E.coli и очищали с применением стандартной Ni-NTA агарозы, применяя элюирование в 500 мМ имидазола. Желательные фракции объединяли и диализовали в ФСБ при pH 7,4. На второй стадии очистки белок загружали на колонку Superdex-75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare),

уравновешенную в ФСБ. Фракции, содержащие Tenson, объединяли и концентрировали с применением концентратора Centriprep UltraCel YM-3 (Amicon). Анализ ДСН-ПААГ показал, что Tenson мигрирует в диапазоне от 6 до 14 кДа, что соответствует ожидаемой массе 10,7 кДа для мономерного белка. Выход чистого белка Tenson составил >50 мг чистого белка на литр культуры.

Биофизическая характеристика Tenson

Структуру и стабильность Tenson характеризовали с помощью спектроскопии кругового дихроизма (CD) и дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) соответственно. Измерения CD проводили на спектрометре AVIV при 20°C в ФСБ и с концентрацией 0,2 мг/мл. Спектр показал минимум при 218 нм, что свидетельствует о структуре типа бета-листа, ожидаемой для белка, относящегося к семейству FN3. Данные DSC получали путем нагрева 0,5 мг/мл растворов 3-го домена FN3 из тенасцина С (TN3) или Tenson в ФСБ от 35°C до 95°C со скоростью 1°C/минута в калориметре N-DSCII (Applied Thermodynamics). Исходя из этих данных, с помощью программного обеспечения CpCalc (Applied Thermodynamics) рассчитали температуры плавления 54°C и 78°C для домена TN3 и Tenson соответственно. Сворачивание и разворачивание обоих доменов при этих температурах является обратимым. Таким образом, созданный каркас Tenson демонстрирует улучшенную термостабильность в сравнении с TN3. На основании этого повышения стабильности можно предположить, что каркас Tenson будет более удобным для аминокислотной замены и более простым в изготовлении. С повышением стабильности каркаса ожидается улучшение порога толерантности к мутациям, снижающим стабильность белка; таким образом, каркас с повышенной стабильностью, по-видимому, обеспечивает получение более функциональных и хорошо свернутых связывающих агентов из библиотеки вариантов каркаса.

Отображение Tenson на фаге M13

Кодирующую аминокислотную последовательность Tenson кДНК (SEQ ID NO: 59) субклонировали в фагмидный вектор экспрессии pPer9 (публикация международного патента № WO2008/079973) с помощью стандартного ПЦР и клонирования фрагментов рестрикции,

позволяя получить вектор рТенсон-рІХ. Этот вектор экспрессирует меченный Мус на N-конце Тенсон в виде слияния по С-концу с N-концом белка рІХ бактериофага М13 под контролем промотора Лас (позволяя получить более низкие уровни экспрессии без IPTG и повышенную экспрессию после добавления IPTG), используя сигнальную последовательность OmpA. Между Тенсон и рІХ вставили короткий линкер TSGGGGS (SEQ ID NO: 60) для предотвращения стерических взаимодействий между этими белками.

Для подтверждения отображения на поверхности частицы фага М13 выращивали трансформанты рТенсон-рІХ из одной колонии в XL1-Blue *E. coli* при температуре 37°C до достижения середины логарифмического роста и спасали с помощью 6¹⁰ БОЕ фага-помощника VCSM13. Через 16 часов размножения в среде 2YT с добавлением ампициллина с последующей индукцией 1 мМ IPTG со спасенных культур собирали супернатанты, центрифугировали их при 4000 X g в течение 20 минут и хранили при 4°C для анализа.

Чтобы подтвердить отображение конструктора Мус-Тенсон на поверхности фага М13, применяли связывание фаговых частиц с антителом анти-Мус (Life Technologies, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Планшет Maxisorp на ночь покрывали антителом анти-Мус или анти-αv (отрицательный контроль) с концентрацией 2,5 мкг/мл и блокировали с помощью SuperBlock T20 (Thermo Scientific, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). Вышеописанный супернатант фагмидной культуры дважды последовательно разбавляли ФСБ и добавляли в лунки покрытого планшета. Через 1 час планшет промывали TBST и в каждую лунку добавляли антитело анти-М13 HRP и промывали TBST после 1-часовой инкубации. Добавляли субстрат Roche BD ELISA POD и обнаруживали люминесценцию на спектрофотометре для прочтения планшетов Tecan.

ПРИМЕР 2. Стабилизирующие мутации в Тенсон

Были описаны библиотеки Тенсон FG7 и BC6/FG7, выполненные с возможностью внесения разнообразия в петли FG и одновременно петли FG и BC (публикация патента США № 2010/0255056; публикация патента США № 2010/0216708).

Разработка вариантов

Мутанты были выполнены с возможностью повышения стабильности сворачивания Tencon (SEQ ID NO: 16). Провели несколько точечных мутаций для получения замены отдельных остатков SEQ ID NO: 16, таких как N46V (Tencon17; SEQ ID NO:17), E14P (Tencon18; SEQ ID NO:18), E11N (Tencon19; SEQ ID NO:19), E37P (Tencon20; SEQ ID NO:20) и G73Y (Tencon21; SEQ ID NO:21), для которых прогнозировали повышение стабильности каркаса с помощью программы PoPMuSiC v2.0 (Dehouck et al., Bioinformatics, 25, 2537–2543, 2009 г.). Ранее было обнаружено, что мутант E86I (Tencon22; SEQ ID NO:22) стабилизирует гомологичный белок, 3-й домен FN3 тенацина С человека (WO2009/086116). В экспериментах с аланиновым сканированием, в которых все остатки петли Tencon независимо заменяли на аланин, было обнаружено, что мутация L17A (Tencon26; SEQ ID NO: 26) значительно стабилизирует Tencon (данные не показаны). После исходного этапа анализов стабильности для дополнительного повышения стабильности сформировали комбинаторные мутанты N46V/E86I (Tencon23; SEQ ID NO:23), E14P/N46V/E86I (Tencon24; SEQ ID NO:24) и L17A/N46V/E86I (Tencon25; SEQ ID NO:25).

Экспрессия и очистка

Мутации в кодирующей Tencon последовательности проводили с применением набора для мутагенеза QuikChange (Stratagene) и мутантные белки экспрессировали и очищали с применением стандартных протоколов в виде слитых белков HIS₆. Белки элюировали из колонок Ni-NTA (Novagen) в 50 mM растворе фосфата натрия при pH 7,4, 500 mM NaCl и 250 mM имидазола. После элюирования белки диализовали в ФСБ при pH 7,4.

Характеризация термостабильности

Термостабильность Tencon и каждого мутантного белка в ФСБ при pH 7,4 (2–3 мг/мл) измеряли с помощью капиллярной дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Для этих образцов измеряли температуры плавления с применением прибора VP-DSC, оснащенного автоматическим пробоотборником (MicroCal, LLC). Образцы нагревали с 10°C до 95°C или 100°C со скоростью 1°C в минуту. Между сканированием каждого образца проводили

сканирование только буферного раствора для расчета базовой линии для интегрирования. После вычитания сигнала только от буферного раствора данные аппроксимировали в соответствии с моделью сворачивания с двумя состояниями. Обратимость термической денатурации определяли путем повторного сканирования каждого образца без его извлечения из клетки. Обратимость рассчитывали путем сравнения площади под фармакокинетической кривой, полученной при 1-ом сканировании и при 2-ом сканировании. Результаты экспериментов с DSC представлены в таблице 3 в виде значений, полученных из полных кривых плавления (T_m (ккал)). Одиночные мутанты Tencon17, Tencon18, Tencon19 и Tencon22 имели повышенную термостабильность в сравнении с родительской последовательностью Tencon. Значительную дестабилизацию наблюдали только для Tencon21. Комбинаторные мутанты Tencon23, Tencon24 и Tencon25 и т.п. имели значительно более высокую стабильность, что указывает на накопительный эффект разработанных мутаций в отношении повышения термостабильности.

Денатурация гидрохлоридом гуанидина

Для оценки стабильности применяли измерение способностей Tencon и каждого мутанта оставаться свернутыми при обработке растущими концентрациями гидрохлорида гуанидина (GdmCl) по результатам измерения флуоресценции триптофана. Tencon содержит только один остаток триптофана. Остаток триптофана находится внутри гидрофобного ядра и, таким образом, эмиссия флуоресценции на 360 нм является чувствительным измерением свернутого состояния этого белка. В черные 96-луночные планшеты без связывания (Greiner) добавляли по 200 мкл раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия при pH 7,0, 150 мМ NaCl и изменяемые концентрации GdmCl от 0,48 до 6,63 М для получения титрования по 17 точкам. В каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл раствора, содержащего мутанты Tencon, до конечной концентрации белка 23 мкМ и перемешивали содержимое лунок осторожным пипетированием вверх и вниз. После инкубирования при комнатной температуре в течение 24 часов считывали флуоресценцию на спектрофотометре для прочтения планшетов

Spectramax M5 (Molecular Devices, г. Саннивэйл, штат Калифорния, США) с возбуждением на 280 нм и эмиссией на 360 нм. Сигнал флуоресценции конвертировали в развернутую фракцию с применением следующего уравнения (Pace Methods Enzymol, 131, 266–280, 1986 г.):

$$f_u = (y_F - y)/(y_F - y_U),$$

где y_F – сигнал флуоресценции свернутого образца, а y_u – развернутого образца.

Средние точки перехода разворачивания и наклон перехода определяли путем аппроксимирования с применением следующего уравнения (Clarke et al., 1997 г.):

$$F = \frac{(\alpha_N + \beta_N[D]) + (\alpha_D + \beta_D[D])\exp(m([D] - [D]_{50\%})/RT)}{1 + \exp(m([D] - [D]_{50\%})/RT)},$$

где F – флуоресценция при заданной концентрации денатурирующего агента, α_N α_D – отсечения оси y для нативного и денатурированного состояния, β_N β_D – наклоны базовых линий для нативного и денатурированного состояния, $[D]$ – концентрация GdmCl, $[D]_{50\%}$ – концентрация GdmCl, при которой 50% образца находится денатурировано, m – наклон перехода, R – газовая постоянная, а T – температура. Свободную энергию сворачивания для каждого образца оценивали с применением следующего уравнения (Pace 1986, см. выше; Clarke et al., J Mol Biol 270, 771–778, 1997 г.): $\Delta G = m[D]_{50\%}$.

Зачастую для таких кривых сложно точно измерить наклон перехода (m). В дополнение к этому можно ожидать, что описанные в настоящем документе мутации не изменят механизм сворачивания Tenson. Таким образом, для каждого мутанта измеряли значение m и усредняли значения (Pace 1986, см. выше), получив $m=3544$ кал/моль/М, которую применяли во всех расчетах свободной энергии. Результаты этих расчетов представлены в таблице 3. Результаты экспериментов по разворачиванию GdmCl показывают, что те же мутанты, которые стабилизируют Tenson в отношении термостабильности, также стабилизируют белок относительно

индуцируемой GdmCl денатурации.

Таблица 3

Конструкт	Мутации	T _m (ккал)	[D] _{50%} (M)	DG (H ₂ O) (ккал/мо)	SEQ ID NO:
Tencon		78,04	3,4	12	16
Tencon17	N46V	81,88	3,6	12,8	17
Tencon18	E14P	82,77	3,5	12,4	18
Tencon19	E11N	79	3,4	12	19
Tencon20	E37P	77,4	3,4	12	20
Tencon21	G73Y	67,56	2,4	8,5	21
Tencon22	E86I	82,78	3,7	13,1	22
Tencon23	N46V/E86	86,65	4,1	14,5	23
Tencon24	E14P/N46	87,47	4	14,2	24
Tencon25	L17A/N46	92,73	5,1	18,1	25
Tencon26	L17A	84,9	4,6	16,2	26

Эксклюзионная хроматография

Применяли эксклюзионную хроматографию (SEC) для оценки состояния агрегации Tencon и каждого варианта Tencon. По 5 мкл каждого образца инжестировали на колонку Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин с ФСБ в качестве подвижной фазы. Элюирование с колонки контролировали по поглощению на 280 нм. Для оценки состояния агрегации колонку предварительно калибровали с помощью глобулярных стандартов молекулярной массы (Sigma). Все тестированные образцы, за исключением Tencon21, элюировались одним пиком при объеме элюирования, соответствующем мономерному образцу. Tencon21 элюировался 2 пиками, что указывает на наличие агрегатов.

ПРИМЕР 3. Создание библиотек Tencon с альтернативными поверхностями связывания

Разработка библиотеки TCL14

Выбор остатков для рандомизации конфигурации конкретной библиотеки определяет общую форму созданной поверхности взаимодействия. Рентгеновский кристаллографический анализ содержащего домен FN3 каркасного белка, выбранного для связывания связывающего мальтозу белка (MBP) из библиотеки с рандомизированными петлями BC, DE и FG, показал наличие значительно искривленной поверхности взаимодействия, соответствующей активному сайту MBP (Koide et al., Proc Natl

Acad Sci U S A, 104, 6632–6637, 2007 г.). Напротив, было обнаружено, что у каркасного белка на основе повтора анкирина, выбранного для связывания с MBR, была значительно более плоская поверхность взаимодействия, при этом он связывался с внешней поверхностью MBR, которая удалена от активного сайта (Binz et al., Nat Biotechnol, 22, 575–58, 2004 г.). Эти результаты свидетельствуют о том, что форма связывающей поверхности молекулы каркаса (криволинейная или плоская) может определять, какие белки-мишени или конкретные эпитопы на этих белках-мишенях каркас могут быть эффективно связаны каркасом. Опубликованные попытки по конструированию содержащих домены FN3 белковых каркасов для связывания белка опирались на конструирование смежных петель (фиг. 1) для связывания мишени, таким образом позволяя получить криволинейные поверхности связывания. Этот подход может ограничивать число мишеней и эпитопов, доступных для таких каркасов.

Tenson и другие домены FN3 содержат два набора CDR-подобных петель, лежащих на противоположных сторонах молекулы, причем первый набор образован петлями BC, DE и FG, а второй набор образован петлями AB, CD и EF. Два набора петель разделены бета-тяжами, которые образуют центр структуры FN3 (фиг. 1, 2A). При повороте изображения структуры Tenson, представленной на фиг. 1, на 90 градусов можно визуализировать альтернативную поверхность (фиг. 2B). Эта несколько вогнутая поверхность образована петлями CD и FG и двумя антипараллельными бета-тяжами C и F, и в настоящем документе называется поверхностью C-CD-F-FG (фиг. 2B). Поверхность C-CD-F-FG можно применять в качестве шаблона для разработки библиотек поверхностей взаимодействия белкового каркаса путем рандомизации подмножества остатков, образующих поверхность. Бета-тяжи имеют повторяющуюся структуру, в которой боковая цепь каждого второго остатка открыта на поверхности белка. Таким образом, библиотеку можно получить путем рандомизации некоторых или всех открытых на поверхности остатков бета-тяжей. Путем выбора соответствующих остатков в бета-тяжах можно получить уникальную поверхность каркаса для взаимодействия с другими

белками при минимальной потере присущей каркасу Tencon стабильности.

Разработали новую библиотеку, называемую в настоящем документе TCL14 (SEQ ID NO: 28), на основе каркаса Tencon25 (SEQ ID NO: 25) с дополнительной заменой E11R (Tencon27, SEQ ID NO: 27) (фиг. 2В, 3). Положения петель и тяжей и их последовательности показаны в таблице 4 и таблице 5 для Tencon27 (SEQ ID NO: 27) и TCL14 (SEQ ID NO: 28) соответственно. В таблице 5 «X» обозначает любую аминокислоту.

Tencon27 (SEQ ID NO: 27):

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDL
TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO: 28):

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDL
TGLKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSAIFTT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

Два бета-тяжа, образующие поверхность C-CD-F-FG в Tencon27, имеют в совокупности 9 открытых на поверхности остатков, которые можно рандомизировать; тяж С: S30, L32, Q34, Q36; тяж F: E66, T68, S70, Y72 и V74, тогда как петля CD имеет 6 потенциальных остатков: S38, E39, K40, V41, G42 и E43, а петля FG имеет 7 потенциальных остатков: K75, G76, G77, H78, R79, S80 и N81 (фиг. 5). В конфигурацию TCL14 для включения избрали только выбранные остатки вследствие большего теоретического размера библиотеки при рандомизации всех 22 остатков.

Для рандомизации выбрали тринадцать положений в Tencon27 (SEQ ID NO: 27): L32, Q34 и Q36 в тяже С, S38, E39, K40 и V41 в петле CD, T68, S70 и Y72 в тяже F, H78, R79 и N81 в петле FG. В тяжах С и F не рандомизировали S30 и E66, поскольку они находятся непосредственно за петлями CD и FG и не являются явным образом частью поверхности C-CD-F-FG. В петле CD не рандомизировали G42 и E43, поскольку глицин, обеспечивающий гибкость, может быть ценным в областях петли, а E43 находится в точке соединения с поверхностью. В петле FG исключили K75, G76, G77 и S80. Глицины исключили по вышеуказанным причинам, в то

время как тщательное исследование кристаллических структур показало, что S80 образует ключевые контакты с ядром и помогает образовать стабильную петлю FG. K75 обращен от поверхности C-CD-F-FG и был менее привлекательным кандидатом для рандомизации. Хотя вышеуказанные остатки не были рандомизированы в исходной конфигурации TCL14, их можно было включить в последующие конфигурации библиотеки для обеспечения дополнительного разнообразия для выбора *de novo* или, например, для библиотеки повышения аффинности на основе выбранного конкретного варианта мишени для TCL14.

Таблица 4

Область	Положения	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	(в SEQ ID)		
Тяж А	1-12	LPAPKNLVVSRV	29
Петля АВ	13-16	TEDS	30
Тяж В	17-21	ARLSW	31
Петля ВС	22-28	TAPDAAF	32
Тяж С	29-37	DSFLIQYQE	33
Петля CD	38-43	SEKVGE	34
Тяж D	44-50	AIVLTVP	35
Петля DE	51-54	GSER	36
Тяж Е	55-59	SYDLT	37
Петля EF	60-64	GLKPG	38
Тяж F	65-74	TEYTVSIYGV	39
Петля FG	75-81	KGGHRSN	40
Тяж G	82-89	PLSAIFTT	41
Тяж С+петля CD	29-43	DSFLIQYQESEKVGE	42
Тяж F+петля FG	65-81	TEYTVSIYGVKGGHRSN	43
Тяж А+петля АВ + тяж В+петля ВС	1-28	LPAPKNLVVSRVTEDSA RLSWTAPDAAF	44

В отличие от существующих конфигураций библиотеки на основе существующего каркаса FN3 (Koide, et al. J Mol Biol, 284, 1141-1151, 1998 г.; Koide et al., Proc Natl Acad Sci USA 104, 6632-6637, 2007 г.; (Dineen et al., BMC Cancer, 8, 352-361, 2008 г.; Olson and Roberts, Protein Sci, 16, 476-484, 2007 г.; Xu et al., Chemistry & Biology, 9, 933-942, 2002; Karatan et al., Chem Biol, 11, 835-844, 2004 г.; Hackel et al., J Mol

Biol, 401, 84–96, 2010; Hackel et al., J Mol Biol 381, 1238–1252, 2008 г.; Koide et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 6632–6637, 2007 г.; Lipovsek et al., J Mol Biol, 368, 1024–1041, 2007 г.; публикация международного патента № WO2009/133208; публикация международного патента № WO2009/058379; патент США № 7115396), поверхность разработанной библиотеки TCL14 не имеет структурного сходства с переменными доменами или CDR антитела или ранее описанными библиотеками FN3. Вследствие создания большой поверхности взаимодействия в такой конфигурации можно быстро выделить молекулы с высокой аффинностью связывания, возможно, без необходимости в стадиях повышения аффинности. Поскольку в данной конфигурации не проводится

Таблица 5

Область	Положения аминокислот	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	(в SEQ ID NO: 28)		
Тяж С	29–37	DSFXIXYXE	45
Тяж F	65–74	TEYXVXIXGV	46
Тяж С +	29–43	DSFXIXYXEXXXGE	47
Тяж F +	65–81	TEYXVXIXGVKGGXXSX	48
Тяж А +	1–28	LPAPKXLXVXXVXXXAX	49
петля АВ +		L XWXAPDAAF	
Тяж Е	55–59	XYXLT	50

Рандомизация длинных фрагментов последовательных аминокислот, она может давать связывающие молекулы на основе FN3 с большей растворимостью и стабильностью, чем ранее описанные библиотеки. Описанная библиотека TCL14 дает плоскую или вогнутую поверхность взаимодействия в сравнении с криволинейной поверхностью предыдущих библиотек. Таким образом, выбранные из TCL14 молекулы на основе FN3, вероятно, связывают отдельные антигены и эпитопы, как и молекулы из предыдущих конфигураций библиотеки FN3. Конфигурация библиотеки TCL14 также может позволить получать две отдельные поверхности связывания на одной и той же молекуле для достижения биспецифичности.

Создание библиотеки TCL14

Вышеописанную библиотеку TCL14 экспрессировали с применением системы цис-дисплея (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101: 2806–2810, 2004 г.). В этой системе библиотеку лигатируют с фрагментами ДНК, кодирующими кодирующую RepA последовательность, элементы цис и ori и промотор Tac, и полученный продукт лигатирования транскрибируют/транслируют *in vitro*. Сформированные слитые белки TCL14-RepA связаны в цис с ДНК, которой кодируются слитые белки. Провели скрининг библиотеки на каркасные молекулы, специфически связывающиеся с исследуемыми белками, молекулы выделили и связанную ДНК амплифицировали для выявления кодирующих последовательностей связанных каркасных молекул.

Библиотеку TCL14 создали путем рандомизации положений L32, Q34, Q36 (тяж C), S38, E39, K40, V41 (петля CD), T68, S70, Y72 (тяж F), H78, R79 и N81 (петля FG) в Tencon 27 (SEQ ID NO: 27), применяя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с вырожденными праймерами, и клонировали 5' к гену RepA для цис-дисплея, применяя стандартные протоколы. Для рандомизации тяжа C и петли C:D применяли праймер C-CD N46V (SEQ ID NO. 51), для рандомизации тяжа F и петли F:G применяли праймер F-FG-Sf E86I-R (SEQ ID NO. 52). Продукт лигатирования амплифицировали с праймерами R1RecFor (SEQ ID NO: 53) и DigLigRev (SEQ ID NO: 54) для создания библиотеки TCL14 для транскрипции/трансляции *in vitro*. Последовательности использованных праймеров показаны в таблице 6. Для диверсификации применяли кодон NNS (код IUB; N означает A, C, G или T; S означает C или G).

Таблица 6

Название праймера	Последовательность	SEQ ID NO
C-CD N46V	GCGGCGTTCGACTCTTTCNNSATCNNSTACNNSGAANNNSN NSNNSNNSG GTGAAGCGATCGGTCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTTC	51
F-FG-Sf E86I-R	GGTGGTGAAGATCGCAGACAGCGGSNNAGASNNSNACCA CCTTTAAC	52

R1RecFor	GAACGCGGCTACAATTAATACATAACC	53
DigLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA	54
TCON6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC	55
TCON5 E86I короткий	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGTGAC CACCGGTG GTGAAGATCGCAGACAG	56

Характеризация библиотеки TCL14

Созданную библиотеку TCL14 клонировали с помощью ПЦР в модифицированный вектор pET15 (EMD Biosciences), содержащий независимый от лигазы сайт клонирования (pET154-LIC), применяя праймеры TCON6 (SEQ ID NO: 55) и TCON5 E86I короткий (SEQ ID NO: 56), и белки экспрессировали как белки, меченные His6 на C-конце, после трансформаций и индукции IPTG (конечная концентрация 1 мМ, 30°C в течение 16 часов), применяя стандартные протоколы. Клетки собирали путем центрифугирования и впоследствии лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Chemicals, г. Гиббстаун, штат Нью-Джерси, США) с добавлением 0,2 мг/мл лизозима из белка куриного яйца (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США). Бактериальные лизаты очищали путем центрифугирования и супернатанты переносили в новые 96-луночные планшеты deerwell. Белки очищали с применением 96-луночного планшета Ni-NTA Multitrap Plate (GE Lifesciences, г. Пискатавэй, штат Нью-Джерси, США).

Для оценки полученного распределения в библиотеке проводили случайный выбор клонов и последовательностей. Наблюдаемое разнообразие в библиотеке было хорошо согласовано с ожидаемым (фиг. 7). Для расчета наблюдаемого разнообразия во всех полноразмерных клонах библиотеки подсчитывали общее число раз, которое данная аминокислота появлялась в диверсифицированных областях библиотеки, и делили на общее число случайных положений (13 случайных положений в библиотеке * 69 полноразмерных клонов) и умножали на 100 для получения частоты в процентах (%). Ожидаемое разнообразие основано на

врожденном кодоне NNS со следующим распределением аминокислот: Phe=1, Leu=3, Ile=1, Met=1, Val=2, Ser=3, Pro=2, Thr=2, Ala=2, Cys=1, Arg=3, Gly=2, Tyr=1, His=1, Gln=1, Asn=1, Lys=1, Asp=1, Glu=1, Trp=1 кодона (-ов), разделенных на общее число кодонов (32) и умноженных на 100 для получения частоты в процентах (%).

С очищенными белками проводили эксклюзионную хроматографию для определения склонности к агрегации отдельных членов библиотеки. Определяли профили элюирования выбранных клонов путем инжектирования 10 мкл очищенных белков на колонку Superdex 75 5/150 с применением ВЭЖХ-анализатора Agilent 1200 со считыванием поглощения на 280 нм. Приблизительно 80% не содержащих цистеин клонов элюировались в виде одного мономерного пика, таким образом указывая на то, что большинство отдельных членов библиотеки сохранили присущую им растворимость и структуру родительской молекулы. Для некоторых содержащих свободный цистеин молекул обнаружили окисление после очистки и, таким образом, элюирование в виде димерных молекул.

Для дополнительной характеристики клонов, по результатам SEC имеющих моодисперсный профиль, применяли дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC). Данные DSC получали путем нагрева растворов 0,5 мг/мл для каждого клона в ФСБ с 35°C до 95°C со скоростью 1°C/мин в микрокалориметре с капиллярной ячейкой VP-DSC (Microcal, LLC, г. Пискатавэй, штат Нью-Джерси, США). Температуры плавления для каждого клона рассчитывали с применением программного обеспечения CpCalc (Microcal, LLC, г. Пискатавэй, штат Нью-Джерси, США), причем сводные данные представлены в таблице 7. Средняя температура плавления тестированных молекул составляла 70±9°C. Полученные данные показывают, что конфигурация библиотеки TCL14 дает молекулы каркаса, которые сохранили значительную часть термостабильности родительской молекулы Tencon25 (93°C) и по природе являются термостабильными и хорошо свернутыми.

Таблица 7

Номер клона	T _m (°C)	Номер клона	T _m (°C)
TcCF-003	60	TcCF-084	62,3
TcCF-004	61,5	TcCF-090	70,2
TcCF-006	76,3	TcCF-092	71,5
TcCF-031	71,2	TcCF-103	51
TcCF-041	71	TcCF-106	87,3
TcCF-078	68	TcCF-107	74,5
TcCF-082	87	TcCF-111	68
TcCF-083	72,3		

Выбор из библиотеки TCL14 молекул, специфически связывающихся с исследуемыми молекулами-мишенями

Был проведен скрининг библиотеки TCL14 на различные белки-мишени различных классов белка, состоящих из внеклеточных доменов рецептора клеточной поверхности, цитокинов, киназ, фосфатаз, белков теплового шока и иммуноглобулинов, а также их фрагментов для выявления каркасных молекул, специфически связывающихся с этими белками и/или доменами белков. Очищенные растворимые белки, экспрессированные в клетках HEK293 или *E. coli*, биотинилировали с применением микропробирок EZ-Link No-Weigh Sulfo-NHS-LC-Biotin Microtubes (Thermo Fisher, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США) с последующим интенсивным диализом в ФСБ. Для проведения выбора по 3 мкг библиотеки TCL14 транскрибировали и транслировали *in vitro* (IVTT) в линейном экстракте S30 *E. Coli* (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), и экспрессированную библиотеку блокировали реагентом Cis Block (2% BSA (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США), 100 мкг/мл ДНК спермы сельди (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), 1 мг/мл гепарина (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США)). Для проведения выбора каждый биотинилированный белок-мишень добавляли в концентрациях 400 нМ (этап 1), 200 нМ (этапы 2 и 3) и 100 нМ (этапы 4 и 5). Связанные члены библиотеки извлекали с применением магнитных гранул с нейтравидином (Thermo Fisher, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США) (этапы 1, 3, и 5) или магнитных гранул со

стрептавидином (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США) (этапы 2 и 4), а несвязанные члены библиотеки были удалены путем промывки гранул 5–14 раз с помощью 500 мкл PBST с последующей 2-кратной промывкой с помощью 500 мкл ФСБ.

После проведения 5 этапов выбора ДНК на выходе амплифицировали с помощью ПЦР и субклонировали в pET154-LIC с применением стандартных протоколов.

Для выявления каркасных молекул с повышенными аффинностями к двум белкам-мишеням провели дополнительные этапы выбора. Вкратце, выходы этапа 5 приготовили как описано выше и провели дополнительные итерационные этапы выбора со следующими изменениями: инкубацию с биотинилированным белком-мишенью снизили с 1 часа до 15 минут, продолжительность захвата на гранулы снизили с 20 минут до 15 минут, биотинилированный белок-мишень снизили до 25 нМ (этапы 6 и 7) или 2,5 нМ (этапы 8 и 9) и провели дополнительную 1-часовую промывку при наличии избытка небитинилированного белка-мишени. Цель этих изменений заключалась в одновременном выборе связывающихся агентов с потенциально более высокой скоростью ассоциации и более низкой скоростью диссоциации, что позволяет получить по существу меньшее значение K_D . Выход из 9-го этапа амплифицировали с помощью ПЦР, клонировали и экспрессировали, как описано выше.

Характеризация *in vitro* каркасных молекул, связывающихся с исследуемыми белками и/или доменами белка

Связывание

Провели иммуноферментный анализ (ИФА) на 188 отдельных клонах из выходов 5-го этапа пэннинга. Планшеты Maxisorp (Nunc, г. Рочестер, штат Нью-Йорк, США) в течение ночи выдерживали покрытыми 0,1 мкг антитела анти-His (Qiagen, г. Валенсия, штат Калифорния, США), промывали буферизованным Tris физиологическим раствором при pH 7,4 с 0,05% Tween-20 (TBST) и блокировали с применением Starting Block T20 (Thermo Fisher, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). Осветленные бактериальные лизаты, содержащие 1 мкг/мл меченных His₆ слитых белков TCL14-RepA или контрольный белок (сывороточный альбумин человека), нанесли на лунки покрытых планшетов. Планшеты инкубировали в течение 1 часа,

промывали TBST и обнаруживали биотинилированный белок с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch, г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) и хемилюминесцентного субстрата POD (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана, США) с применением спектрофотометра для прочтения планшетов Molecular Devices M5. Характеристики библиотеки оценивали по степени совпадения. Степень совпадения определяли как отношение процентной доли (%) каркасных молекул с сигналом люминесценции, более чем 10-кратно превышающим контрольный сигнал, к общему числу прошедших скрининг клонов (188). Как показано в таблице 8, библиотека TLC14 позволила получить каркасные молекулы со степенью совпадения в диапазоне от 8% до 45% для восьми отдельных белков. Цитокин 2 представляет собой мышинный IL-17A.

Таблица 8

Мишень	Степень совпадения (%)
Ser/Thr-киназа	37
Рецептор ECD	45
Иммуноглобулин	22
Белок теплового шока	18
Цитокин	6
Иммуноглобулин 2	42
Цитокин 2	18
Фосфатаза	8

Характеризация агентов, связывающих мышиный IL-17A

Ингибирование рецепторов IL-17A

Провели анализ ингибирования для определения того, ингибируют ли выходы пэннинга на мышиный IL-17A (mIL-17A) с этапов 5 и 9 связывание mIL-17A с рецептором mIL-17A. Планшеты Maxisorp ночью выдерживали покрытыми 0,2 мкг/мл слитым белком рецептора mIL-17A и домена Fc (R&D Systems, г. Миннеаполис, штат Миннесота, США), промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) при pH 7,4 с добавлением 0,05% Tween-20 (TBST) и блокировали раствором 2% БСА, 5% сахарозы в ФСБ. В осветленные бактериальные лизаты, разбавленные 1:50 в 1% растворе БСА в

ФСБ, добавили 10 нг/мл биотинилированного mIL17A (b-mIL-17A) и инкубировали смеси в течение 20 минут. Заблокированные планшеты промывали и переносили на планшеты инкубационные смеси бактериальных лизатов/b-mIL-17A. Планшеты инкубировали в течение дополнительного часа, промывали PBST и обнаруживали биотинилированный белок с помощью стрептавидина-HRP (Jackson ImmunoResearch, г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) и колориметрического субстрата OPD (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США). Поглощение на 490 нм считывали с применением спектрофотометра для прочтения планшетов M5 (Molecular Devices, г. Саннивейл, штат Калифорния, США) и данные конвертировали в % ингибирования. Процент ингибирования для связывания mIL-17A с рецептором mIL-17 определяли как $100 - (\text{образец}/\text{отрицательный контроль} \times 100)$.

Выбранные бактериальные лизаты, содержащие каркасные молекулы, ингибирующие взаимодействие mIL-17A с рецептором mIL-17, дополнительно характеризовали в анализе зависимости ответа от дозы процесса ингибирования с применением вышеописанного протокола, за исключением того, что в анализах применяли по 100 мкл очищенных слитых белков TCL14-His (Ni-NTA) в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 56 пМ. Из кривых зависимости ответа от дозы рассчитали значения IC₅₀, применяя сигмоидальную аппроксимацию кривой зависимости ответа от дозы. Как показано в таблице 9, специфические ингибиторы mIL-17A имеют значения IC₅₀ в диапазоне от ~9 до ~428 пМ.

Таблица 9

Идентификационный номер клона	IC ₅₀ (пМ)	k _{on} (1/Мс)	k _{off} (1/с)	K _D (М)
TP1KR9P61-A2	33,93	137000	3,93E-05	2,87E-10
TP1KR9P61-A7	55,75	82000	3,46E-05	4,21E-10
TP1KR9P61-E2	42,82	147000	3,96E-05	2,70E-10
TP1KR9P61-G4	8,83	162000	5,02E-05	3,09E-10
TP1KR9P62-A2	261,1	408000	2,17E-05	5,31E-11
TP1KR9P62-C3	117,1	281000	1,05E-05	3,74E-11
TP1KR9P62-C6	109,1	568000	1,20E-05	2,12E-11
TP1KR9P62-D3	91,18	110000	6,07E-05	5,54E-10
TP1KR9P62-D4	242	105000	1,00E-05	9,52E-11

TP1KR9P62-D8	427,5	381000	1,48E-05	3,89E-11
TP1KR9P62-E3	64,16	113000	5,26E-05	4,64E-10
TP1KR9P62-H10	301,8	438000	2,11E-05	4,82E-10

Измерения аффинности

Аффинности выбранных молекул, связывающихся с mIL-17A, измерили с применением метода поверхностного плазмонного резонанса с применением прибора ProteOn XPR-36 (Bio-Rad). Очищенные молекулы иммобилизовали непосредственно на чипе с изменяемыми плотностями (100~300 усл.ед.) с помощью аминного связывания при pH 5,0 и скорости потока 30 мкл/мин в течение 5 минут. Тестировали mIL-17A при 100 нМ в серии 3-кратных разбавлений на их связывание с различными молекулами на поверхности чипа. Фазы диссоциации для всех концентраций всех образцов контролировали в течение 1~2 часов, в зависимости от их скорости диссоциации, при скорости потока 100 мкл/мин. Для контроля стабильности базовой линии инжесктировали буферный раствор, и поверхность не регенерировали для дальнейшего применения. С данными по ответу для всех серий концентрации для каждой из различных поверхностей каркасных молекул, выбранных из библиотеки TLC14, провели глобальную аппроксимацию с 1:1 простой ленгмюровской моделью связывания для экстракции оценочных значений кинетических (k_{on} , k_{off}) констант и константы аффинности (K_D). Как показано в таблице 9, аффинности каркасных молекул, специфически связывающих mIL-17A, находились в субнаномолярном диапазоне.

Последовательности выбранных агентов, связывающих mIL-17A, показаны в SEQ ID NO: 85–96, а последовательности бета-тяжей С и F и петель CD и FG – в таблице 10.

Таблица 10.

Идентификационный номер клона	Тяж С		Петля CD	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
TP1KR9P61-A2	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P61-A7	DSFAIEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P61-E2	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P61-G4	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67

TP1KR9P62-A2	DSFAEYSE	64	DYWLGE	68
TP1KR9P62-C3	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P62-C6	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P62-D3	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P62-D4	DSFGIIYFE	65	DWWAGE	69
TP1KR9P62-D8	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P62-E3	DSFGHEYFE	66	DYWTGE	70
TP1KR9P62-H10	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67

Идентификационный номер клона	Тяж F		Петля FG	
	Последова- тельность	SEQ ID NO:	Последова- тельность	SEQ ID NO:
TP1KR9P61-A2	TEYAVSIRGV	71	KGGMPSA	75
TP1KR9P61-A7	TEYSVSIRGV	72	KGGYPSS	76
TP1KR9P61-E2	TEYAVSIRGV	71	KGGMPSP	77
TP1KR9P61-G4	TEYAVSIRGV	71	KGGYPSA	78
TP1KR9P62-A2	TEYGVSIRGV	73	KGGYPSP	79
TP1KR9P62-C3	TEYSVTIRGV	74	KGGPPSS	80
TP1KR9P62-C6	TEYSVTIRGV	74	KGGYPSS	81
TP1KR9P62-D3	TEYSVSIRGV	72	KGGYPSS	81
TP1KR9P62-D4	TEYGVSIRGV	73	KGGPPSR	82
TP1KR9P62-D8	TEYGVSIRGV	73	KGGLASP	83
TP1KR9P62-E3	TEYAVSIRGV	71	KGGYPSA	78
TP1KR9P62-H10	TEYSVSIRGV	72	KGGHPSV	84

ПРИМЕР 4. Библиотеки Tencon27, рандомизированные по второй альтернативной поверхности

Вторая альтернативная поверхность на Tencon27 находится с противоположной стороны от поверхности C-CD-F-FG, как показано в визуализации на фиг. 2С, и в настоящем документе называется поверхностью A-AB-B-BC-E, причем она образована бета-тяжем А, петлей АВ, бета-тяжем В, петлей ВС и бета-тяжем Е. Поверхность A-AB-B-BC-E также несколько вогнута и может применяться в качестве шаблона для разработки библиотек поверхностей взаимодействия белкового каркаса путем рандомизации подмножества остатков, образующих поверхность. Бета-тяжи имеют повторяющуюся структуру, в которой боковая цепь каждого второго остатка открыта на поверхности белка. Таким образом, библиотеку можно создать путем рандомизации некоторых или всех открытых на поверхности остатков бета-тяжей. Путем выбора соответствующих

остатков в бета-тяжах можно обеспечить уникальную поверхность каркаса для взаимодействия с другими белками при минимальной потере присущей каркасу Tencon27 стабильности. Рандомизация поверхности A-AB-B-BC-E позволит получить поверхность связывания на противоположной стороне структуры Tencon27 в сравнении с конфигурацией библиотеки TCL14. Конфигурация библиотеки на основе Tencon27 с рандомизированной поверхностью A-AB-B-BC-E показана в SEQ ID NO: 61 (библиотека TCL15) и на фиг. 6.

Библиотека TCL15 (SEQ ID NO: 61):

LPAPKXLXVXXVXXXXXAXLXWXAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERXYXL
TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

Создали библиотеку TCL15 и выбрали каркасы, которые специфически связываются с молекулами-мишенями, как описано выше для библиотеки TCL14.

ПРИМЕР 5. Другие домены FN3: создание библиотек путем рандомизации альтернативных поверхностей

Конфигурации библиотек с использованием альтернативных поверхностей, описанных в примерах для каркаса Tencon27, можно применить для других доменов FN3 различных белков вследствие структурного сходства между доменами FN3. Такие домены FN3 могут встречаться в природе или могут быть синтетическими и, например, представлять собой консенсусный каркас Fibcon (SEQ ID NO: 58) на основе консенсусной последовательности фибронектиновых доменов (публикация патента США № 2010/0255056), 10-й домен FN3 фибронектина человека (FN10) (SEQ ID NO: 97), или 3-й домен FN3 тенасцина человека (TN3) (SEQ ID NO: 3), или любой домен FN3, присутствующий в белках, перечисленных в таблице 1.

Конфигурации библиотек для библиотек Fibcon, FN10 и TN3 с рандомизированными альтернативными поверхностями C-CD-F-FG показаны на фиг. 8 и в SEQ ID NO: 62, 98 и 99 соответственно. Разработанные библиотеки синтезировали, экспрессировали и выбирали специфически связывающиеся агенты с применением описанных в настоящем документе протоколов.

Библиотека белкового каркаса на основе Fibcon с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG (SEQ ID NO: 62):

LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYXIXYXPXXXXGEPKELTVPPSSTSVTI
TGLTPGVEYXVXLXALKDNXXSXPLVGTQTT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

Библиотека белкового каркаса на основе FN10 с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG (SEQ ID NO: 98):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYXIXYXEXXXXXSPVQEFTVPGSKSTAT
ISG LKPGVDYXIXVXAVTGRGDSPXXSXPIINRYRT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

Библиотека белкового каркаса на основе TN3 с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG (SEQ ID NO: 99):

DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIXLXYXIXXXXGDRTTIDLTEENQYSIG
NLKPDTEYXVXLXSRRGDXXSXPAKETFTT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

Аналогично описанному для каркаса Tencon27, некоторые или все из остатков, содержащих петли CD и/или FG других доменов FN3, можно заменить по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 рандомизированным положениям для создания библиотек различной длины.

Будет понятно, что реализация настоящего изобретения на практике может отличаться от конкретно описанного в предшествующем описании и примерах. Возможно множество модификаций и изменений настоящего изобретения в свете вышеизложенных идей, и, следовательно, в рамках приложенных пунктов формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> БЕЛКОВЫЕ КАРКАСЫ НА ОСНОВЕ ФИБРОНЕКТИНОВОГО ПОВТОРА ТИПА III С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ПОВЕРХНОСТЯМИ СВЯЗЫВАНИЯ

<130> CEN5315WOPST

<140> Переуступка прав

<141> 2012-09-27

<150> 61/539670

<151> 2011-09-27

<160> 101

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val
1 5 10 15

Asn Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val
20 25 30

Tyr Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro
35 40 45

Gly Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu
50 55 60

Tyr Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro
65 70 75 80

Val Ser Ala Arg Val Ala Thr
85

<210> 2

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe Lys Ser Ile Lys Glu
1 5 10 15

Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp Ile Ala Phe Glu Thr

20

25

30

Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu Asp Glu Gly Glu Ile
 35 40 45

Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr Arg Gln Thr Gly Leu
 50 55 60

Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His Ile Val Lys Asn Asn
 65 70 75 80

Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr Thr Arg Leu Asp
 85 90 95

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu
 20 25 30

Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu
 35 40 45

Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr
 50 55 60

Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn
 65 70 75 80

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 4

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Gly Leu Asp Ala Pro Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp
 1 5 10 15

Asn Ser Ile Thr Leu Glu Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser
 20 25 30

Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val
35 40 45

Asp Val Pro Lys Ser Gln Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly
50 55 60

Leu Arg Pro Gly Thr Glu Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Asn Pro Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp
85 90 95

Thr Pro Lys Asp
100

<210> 5
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu
20 25 30

Asn Tyr Ser Leu Pro Thr Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg
35 40 45

Asn Thr Thr Ser Tyr Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr
50 55 60

Asn Val Leu Leu Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala
65 70 75 80

Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
85

<210> 6
<211> 92
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr Glu Val Gly Trp Asp
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp Gln Ala Tyr Glu His Phe

20

25

30

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

Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala
 50 55 60

Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg
 65 70 75 80

Thr Pro Val Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Glu
 85 90

<210> 7

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val Ala Glu Val Gly Trp Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe
 20 25 30

Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu
 35 40 45

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

Ala Thr His Tyr Thr Ile Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Pro Leu Ser Val Glu Val Leu Thr Glu
 85 90

<210> 8

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr Val Thr Glu Val Ser Trp Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe
 20 25 30

Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu
35 40 45

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

Gly Thr Pro Tyr Thr Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser
65 70 75 80

Thr Arg Pro Leu Ala Val Glu Val Val Thr Glu
85 90

<210> 9
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe
20 25 30

Val Ile Gln Val Gln Glu Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu
35 40 45

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

Ala Thr Pro Tyr Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg
65 70 75 80

Thr Pro Val Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu
85 90 95

<210> 10
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu
1 5 10 15

Ser Phe Asn Leu Ser Trp Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe
20 25 30

Thr Ile Glu Ile Ile Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr

35

40

45

Asn Ile Ser Gly Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro
 50 55 60

Ser Thr Asp Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg
 65 70 75 80

Thr Lys Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu
 85 90

<210> 11
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Leu Pro Leu Leu Glu Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Val Ser Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe
 20 25 30

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

Thr Leu Ser Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr
 50 55 60

Gly Ile Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln
 65 70 75 80

Thr Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu
 85 90

<210> 12
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> homosapiens

<400> 12

Ala Glu Pro Glu Val Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp
 1 5 10 15

Gly Phe Arg Leu Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe
 20 25 30

Val Leu Lys Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile
 35 40 45

Thr Leu Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Leu Thr Gly Leu Arg Glu
50 55 60

Ala Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
65 70 75 80

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met
85 90

<210> 13
<211> 89
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Ser Pro Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala
1 5 10 15

Thr Val Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile
20 25 30

Thr Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp
35 40 45

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val Glu
50 55 60

Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser Glu Pro
65 70 75 80

Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu
85

<210> 14
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Leu Ala Arg Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile
20 25 30

Ser Tyr Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly
35 40 45

Asn Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr

50

55

60

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr Ile
 65 70 75 80

Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu
 85

<210> 15
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> homosapiens

<400> 15

Asp Ser Pro Arg Asp Leu Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Trp Arg Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu
 20 25 30

Val Tyr Glu Ser Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro
 35 40 45

Asp Thr Thr Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr
 50 55 60

Thr Ala Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile
 65 70 75 80

Gln Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu
 85

<210> 16
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С

<400> 16

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 17

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 17

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 18

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 18

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Pro Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 19

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 19

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Asn Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 20

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 20

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Pro Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 21

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с
дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 21

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Tyr Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 22

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 22

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 23

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 23

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 24
<211> 89
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 24

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Pro Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 25
<211> 89
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 25

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser

65

70

75

80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 26

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с
дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 26

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 27

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность FN3 на основе доменов FN3 тенасцина-С с
дополнительными мутациями, повышающими стабильность

<400> 27

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 28
<211> 89
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Библиотека TCL14 на основе каркаса tencon27 с рандомизированной
поверхностью C-CD-F-FG

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (32) .. (32)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (34) .. (34)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (36) .. (36)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (38) .. (41)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (68) .. (68)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (70) .. (70)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (72) .. (72)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (78) .. (79)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения
<222> (81)..(81)
<223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 28

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Xaa
20 25 30

Ile Xaa Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Gly Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
65 70 75 80

Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность тяжа А каркаса tencon27

<400> 29

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
1 5 10

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Tencon27 scaffold AB loop

<400> 30

Thr Glu Asp Ser
1

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж В каркаса tencon27

<400> 31

Ala Arg Leu Ser Trp
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля BC каркаса tencon27

<400> 32

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж С каркаса tencon27

<400> 33

Asp Ser Phe Leu Ile Gln Tyr Gln Glu
1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля CD каркаса tencon27

<400> 34

Ser Glu Lys Val Gly Glu
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж D каркаса tencon27

<400> 35

Ala Ile Val Leu Thr Val Pro
1 5

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля DE каркаса tencon27

<400> 36

Gly Ser Glu Arg
1

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж E каркаса tencon27

<400> 37

Ser Tyr Asp Leu Thr
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля EF каркаса tencon27

<400> 38

Gly Leu Lys Pro Gly
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж F каркаса tencon27

<400> 39

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val
1 5 10

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG каркаса tencon27

<400> 40

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn
1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж G каркаса tencon27

<400> 41

Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
1 5

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж C и петля CD каркаса tencon27

<400> 42

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

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж F и петля FG каркаса tencon27

<400> 43

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
1 5 10 15

Asn

<210> 44

<211> 28

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж A, петля AB, тяж B и петля BC каркаса tencon27

<400> 44

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
20 25

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж С библиотеки TCL14

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (4) .. (4)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (6) .. (6)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (8) .. (8)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 45

Asp Ser Phe Xaa Ile Xaa Tyr Xaa Glu
1 5

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж F библиотеки TCL14

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (4) .. (4)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (6) .. (6)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (8) .. (8)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 46

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Gly Val
1 5 10

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж С и петля CD библиотеки TCL14

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (4) .. (4)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (6) .. (6)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (8) .. (8)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (10) .. (13)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 47

Asp	Ser	Phe	Xaa	Ile	Xaa	Tyr	Xaa	Glu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Glu
1				5				10					15	

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж F и петля FG библиотеки TCL14

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (4) .. (4)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (6) .. (6)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (8) .. (8)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (14) .. (15)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (17) .. (17)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 48

Thr	Glu	Tyr	Xaa	Val	Xaa	Ile	Xaa	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Xaa	Xaa	Ser
1				5				10					15		

Xaa

<210> 49

<211> 28

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяж А, петля АВ, тяж В и петля ВС библиотеки TCL15

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (6) .. (6)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (8) .. (8)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (10) .. (11)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (13) .. (16)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (18) .. (18)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (20) .. (20)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (22) .. (22)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 49

Leu Pro Ala Pro Lys Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa

Ala Xaa Leu Xaa Trp Xaa Ala Pro Asp Ala Ala Phe
20 25

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяж Е библиотеки TCL15

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 50

Xaa Tyr Xaa Leu Thr
1 5

<210> 51
<211> 126
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (19) .. (20)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (21) .. (21)
<223> s is g or c

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (25) .. (26)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (27) .. (27)
<223> s is g or c

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (31) .. (32)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (33)..(33)

<223> s is g or c

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (37)..(38)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (39)..(39)

<223> s is g or c

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (40)..(41)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (42)..(42)

<223> s is g or c

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (43)..(44)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (45)..(45)

<223> s is g or c

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (46)..(47)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (48)..(48)

<223> s is g or c

<400> 51

gcggcggttcg actcttttcnn satcnnstac nnsгаannsn nsnnnsnsgg tгаagcgatc 60

gggtctgaccg ttccgggttc tгаacgttct tacgacctga ccgggtctgaa accgggtacc 120

gaatac 126

<210> 52

<211> 102

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> праймер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (25) .. (25)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (26) .. (27)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (31) .. (31)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (32) .. (33)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (34) .. (34)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (35) .. (36)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (52) .. (52)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (53) .. (54)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (58) .. (58)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (59) .. (60)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (64) .. (64)
 <223> s представляет собой с или g

 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (65) .. (66)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 52
 ggtggtgaag atcgagaca gcggsnnaga snnsnnacca cctttaacac csngatsnn
 aacsngtat tcggtacccg gtttcagacc ggtcaggctc ta

<210> 53
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> праймер

 <400> 53
 gaacgcggct acaattaata cataacc 27

<210> 54
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> праймер

 <400> 54
 catgattacg csaagctcag aa 22

<210> 55
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> праймер

 <400> 55
 aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaaac 37

<210> 56
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> праймер

 <400> 56
 gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaagatcgca 60
 gacag 65

<210> 57
 <211> 2201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 57

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

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys

20

25

30

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

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
 50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
 65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
 85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
 100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
 115 120 125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
 145 150 155 160

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
 165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
 180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
 195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys

275

280

285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly
 385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly
 405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu
 420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg
 435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp
 450 455 460

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys
 465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys
 485 490 495

Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val
 500 505 510

Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala
 515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn

530																	
Gly	Gln	Cys	Val	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Met	Gly	Lys	Asp	Cys	Lys	Glu		
545					550					555					560		
Gln	Arg	Cys	Pro	Ser	Asp	Cys	His	Gly	Gln	Gly	Arg	Cys	Val	Asp	Gly		
				565					570					575			
Gln	Cys	Ile	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	Asp	Cys	Gly	Gln	His		
			580					585					590				
Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Cys	Asn	Asn	Leu	Gly	Gln	Cys	Val	Ser	Gly	Arg		
		595					600					605					
Cys	Ile	Cys	Asn	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	Glu	Asp	Cys	Ser	Glu	Val	Ser		
	610					615					620						
Pro	Pro	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Val	Thr	Glu	Glu	Thr	Val	Asn		
625					630					635					640		
Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	Glu	Met	Arg	Val	Thr	Glu	Tyr	Leu	Val	Val	Tyr		
				645					650					655			
Thr	Pro	Thr	His	Glu	Gly	Gly	Leu	Glu	Met	Gln	Phe	Arg	Val	Pro	Gly		
			660					665					670				
Asp	Gln	Thr	Ser	Thr	Ile	Ile	Gln	Glu	Leu	Glu	Pro	Gly	Val	Glu	Tyr		
		675					680					685					
Phe	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Leu	Glu	Asn	Lys	Lys	Ser	Ile	Pro	Val		
	690					695					700						
Ser	Ala	Arg	Val	Ala	Thr	Tyr	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Gly	Leu	Lys	Phe		
705					710					715					720		
Lys	Ser	Ile	Lys	Glu	Thr	Ser	Val	Glu	Val	Glu	Trp	Asp	Pro	Leu	Asp		
				725					730					735			
Ile	Ala	Phe	Glu	Thr	Trp	Glu	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Met	Asn	Lys	Glu		
			740					745					750				
Asp	Glu	Gly	Glu	Ile	Thr	Lys	Ser	Leu	Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ser	Tyr		
		755					760					765					
Arg	Gln	Thr	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ser	Leu	His		
	770					775					780						
Ile	Val	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Gly	Pro	Gly	Leu	Lys	Arg	Val	Thr	Thr		

785		790		795		800									
Thr	Arg	Leu	Asp	Ala	Pro	Ser	Gln	Ile	Glu	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Asp
				805					810					815	
Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Ile	Asp	Gly
			820					825					830		
Ile	Glu	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ile	Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Asp	Arg	Thr	Thr
		835					840					845			
Ile	Asp	Leu	Thr	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gly	Asn	Leu	Lys
	850					855					860				
Pro	Asp	Thr	Glu	Tyr	Glu	Val	Ser	Leu	Ile	Ser	Arg	Arg	Gly	Asp	Met
865					870					875					880
Ser	Ser	Asn	Pro	Ala	Lys	Glu	Thr	Phe	Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Ala	Pro
				885					890					895	
Arg	Asn	Leu	Arg	Arg	Val	Ser	Gln	Thr	Asp	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Glu
		900						905					910		
Trp	Arg	Asn	Gly	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Ser	Tyr	Arg	Ile	Lys	Tyr	Ala
		915					920					925			
Pro	Ile	Ser	Gly	Gly	Asp	His	Ala	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Lys	Ser	Gln
	930					935					940				
Gln	Ala	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu
945					950					955					960
Tyr	Gly	Ile	Gly	Val	Ser	Ala	Val	Lys	Glu	Asp	Lys	Glu	Ser	Asn	Pro
				965					970					975	
Ala	Thr	Ile	Asn	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Asp	Thr	Pro	Lys	Asp	Leu	Gln
			980					985					990		
Val	Ser	Glu	Thr	Ala	Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Leu	Trp	Lys	Thr	Pro
		995					1000					1005			
Leu	Ala	Lys	Phe	Asp	Arg	Tyr	Arg	Leu	Asn	Tyr	Ser	Leu	Pro	Thr	
	1010					1015					1020				
Gly	Gln	Trp	Val	Gly	Val	Gln	Leu	Pro	Arg	Asn	Thr	Thr	Ser	Tyr	
	1025					1030					1035				
Val	Leu	Arg	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Tyr	Asn	Val	Leu	Leu	

1040															
Thr	Ala	Glu	Lys	Gly	Arg	His	Lys	Ser	Lys	Pro	Ala	Arg	Val	Lys	
1055						1060					1065				
Ala	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Val	Thr	
1070						1075					1080				
Glu	Val	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	
1085						1090					1095				
Gln	Ala	Tyr	Glu	His	Phe	Ile	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	Asn	Lys	
1100						1105					1110				
Val	Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	
1115						1120					1125				
Val	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	
1130						1135					1140				
Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Gln	Gly	Tyr	Arg	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	
1145						1150					1155				
Glu	Ala	Ser	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Asn	Leu	Gly	Glu	Val	Val	Val	
1160						1165					1170				
Ala	Glu	Val	Gly	Trp	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro	
1175						1180					1185				
Glu	Gly	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Phe	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	Asp	
1190						1195					1200				
Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	
1205						1210					1215				
Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	His	Tyr	Thr	Ile	
1220						1225					1230				
Thr	Ile	Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Asp	Phe	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu	Ser	
1235						1240					1245				
Val	Glu	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Met	Gly	Asn	Leu	Thr	
1250						1255					1260				
Val	Thr	Glu	Val	Ser	Trp	Asp	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr	Thr	
1265						1270					1275				
Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asp	Gln	Phe	Thr	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	

1280														
Asp	Gln	Val	Glu	Glu	Ala	His	Asn	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Leu
1295						1300					1305			
Arg	Ser	Met	Glu	Ile	Pro	Gly	Leu	Arg	Ala	Gly	Thr	Pro	Tyr	Thr
1310						1315					1320			
Val	Thr	Leu	His	Gly	Glu	Val	Arg	Gly	His	Ser	Thr	Arg	Pro	Leu
1325						1330					1335			
Ala	Val	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu
1340						1345					1350			
Ala	Val	Ser	Glu	Val	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr
1355						1360					1365			
Ala	Ala	Asp	Asn	Ala	Tyr	Glu	His	Phe	Val	Ile	Gln	Val	Gln	Glu
1370						1375					1380			
Val	Asn	Lys	Val	Glu	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly	Ser
1385						1390					1395			
Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala	Ala	Thr	Pro	Tyr
1400						1405					1410			
Arg	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Arg	Gly	Tyr	Arg	Thr	Pro	Val
1415						1420					1425			
Leu	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gly	Asn
1430						1435					1440			
Leu	Asn	Val	Ser	Asp	Ile	Thr	Pro	Glu	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Trp
1445						1450					1455			
Met	Ala	Thr	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Ile	Ile
1460						1465					1470			
Asp	Ser	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Glu	Tyr	Asn	Ile	Ser	Gly
1475						1480					1485			
Ala	Glu	Arg	Thr	Ala	His	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr	Asp
1490						1495					1500			
Phe	Ile	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Ile	Arg	Thr	Lys
1505						1510					1515			
Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu

1520							1525									1530
Asn	Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Pro	Tyr	Gly	Phe	Thr	Val	Ser		
1535						1540					1545					
Trp	Met	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Leu	Val	Thr	Val		
1550						1555					1560					
Val	Asp	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Leu	Ser		
1565						1570					1575					
Gly	Thr	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Ile		
1580						1585					1590					
Gly	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Gln	Gly	His	Gln	Thr		
1595						1600					1605					
Lys	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Val	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Val		
1610						1615					1620					
Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu		
1625						1630					1635					
Ser	Trp	Thr	Ala	Asp	Glu	Gly	Val	Phe	Asp	Asn	Phe	Val	Leu	Lys		
1640						1645					1650					
Ile	Arg	Asp	Thr	Lys	Lys	Gln	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu		
1655						1660					1665					
Leu	Ala	Pro	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Ile	Thr	Gly	Leu	Arg	Glu	Ala		
1670						1675					1680					
Thr	Glu	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ser	Lys	Gly	Arg	Arg		
1685						1690					1695					
Ser	Gln	Thr	Val	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Met	Gly	Ser	Pro		
1700						1705					1710					
Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Glu	Asn	Ser	Ala	Thr	Val		
1715						1720					1725					
Ser	Trp	Arg	Ala	Pro	Thr	Ala	Gln	Val	Glu	Ser	Phe	Arg	Ile	Thr		
1730						1735					1740					
Tyr	Val	Pro	Ile	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Ser	Met	Val	Thr	Val	Asp		
1745						1750					1755					
Gly	Thr	Lys	Thr	Gln	Thr	Arg	Leu	Val	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Val		

1760														
Glu Tyr	Leu Val	Ser Ile	Ile	Ala Met	Lys Gly	Phe	Glu Glu	Ser						
1775			1780			1785								
Glu Pro	Val Ser	Gly Ser	Phe	Thr Thr	Ala Leu	Asp	Gly Pro	Ser						
1790			1795			1800								
Gly Leu	Val Thr	Ala Asn	Ile	Thr Asp	Ser Glu	Ala	Leu Ala	Arg						
1805			1810			1815								
Trp Gln	Pro Ala	Ile Ala	Thr	Val Asp	Ser Tyr	Val	Ile Ser	Tyr						
1820			1825			1830								
Thr Gly	Glu Lys	Val Pro	Glu	Ile Thr	Arg Thr	Val	Ser Gly	Asn						
1835			1840			1845								
Thr Val	Glu Tyr	Ala Leu	Thr	Asp Leu	Glu Pro	Ala	Thr Glu	Tyr						
1850			1855			1860								
Thr Leu	Arg Ile	Phe Ala	Glu	Lys Gly	Pro Gln	Lys	Ser Ser	Thr						
1865			1870			1875								
Ile Thr	Ala Lys	Phe Thr	Thr	Asp Leu	Asp Ser	Pro	Arg Asp	Leu						
1880			1885			1890								
Thr Ala	Thr Glu	Val Gln	Ser	Glu Thr	Ala Leu	Leu	Thr Trp	Arg						
1895			1900			1905								
Pro Pro	Arg Ala	Ser Val	Thr	Gly Tyr	Leu Leu	Val	Tyr Glu	Ser						
1910			1915			1920								
Val Asp	Gly Thr	Val Lys	Glu	Val Ile	Val Gly	Pro	Asp Thr	Thr						
1925			1930			1935								
Ser Tyr	Ser Leu	Ala Asp	Leu	Ser Pro	Ser Thr	His	Tyr Thr	Ala						
1940			1945			1950								
Lys Ile	Gln Ala	Leu Asn	Gly	Pro Leu	Arg Ser	Asn	Met Ile	Gln						
1955			1960			1965								
Thr Ile	Phe Thr	Thr Ile	Gly	Leu Leu	Tyr Pro	Phe	Pro Lys	Asp						
1970			1975			1980								
Cys Ser	Gln Ala	Met Leu	Asn	Gly Asp	Thr Thr	Ser	Gly Leu	Tyr						
1985			1990			1995								
Thr Ile	Tyr Leu	Asn Gly	Asp	Lys Ala	Glu Ala	Leu	Glu Val	Phe						

2000						2005						2010					
Cys	Asp	Met	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Val	Phe	Leu	Arg			
2015						2020						2025					
Arg	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln	Asn	Trp	Lys	Ala	Tyr			
2030						2035						2040					
Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Glu	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu			
2045						2050						2055					
Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Glu	Leu	Arg			
2060						2065						2070					
Val	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Gly	Glu	Thr	Ala	Phe	Ala	Val	Tyr	Asp			
2075						2080						2085					
Lys	Phe	Ser	Val	Gly	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Tyr	Lys	Leu	Lys	Val			
2090						2095						2100					
Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Asp	Ser	Met	Ala	Tyr	His	Asn			
2105						2110						2115					
Gly	Arg	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Asp	Lys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ala	Ile			
2120						2125						2130					
Thr	Asn	Cys	Ala	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gly	Ala	Phe	Trp	Tyr	Arg	Asn			
2135						2140						2145					
Cys	His	Arg	Val	Asn	Leu	Met	Gly	Arg	Tyr	Gly	Asp	Asn	Asn	His			
2150						2155						2160					
Ser	Gln	Gly	Val	Asn	Trp	Phe	His	Trp	Lys	Gly	His	Glu	His	Ser			
2165						2170						2175					
Ile	Gln	Phe	Ala	Glu	Met	Lys	Leu	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Arg	Asn			
2180						2185						2190					
Leu	Glu	Gly	Arg	Arg	Lys	Arg	Ala										
2195						2200											
<210> 58																	
<211> 89																	
<212> PRT																	
<213> Искусственная последовательность																	
<220>																	
<223> FN3 scaffold based on consensuns fibronecting FN3 domains																	
<400> 58																	

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

Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
20 25 30

Ile Thr Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Pro Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr
35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly
50 55 60

Val Glu Tyr Val Val Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Asn Gln Glu Ser
65 70 75 80

Pro Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr
85

<210> 59
<211> 267
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> кДНК, кодирующая каркас tencon

<400> 59
ctgccggcgc cgaaaaacct gggtgtttct gaagttaccg aagactctct gcgtctgtct 60
tggaccgcgc cggacgcggc gttcgactct ttctgatcc agtaccagga atctgaaaaa 120
gttggtgaag cgatcaacct gaccgttccg ggttctgaac gttcttacga cctgaccggt 180
ctgaaaccgg gtaccgaata caccgtttct atctacggtg ttaaagggtg tcaccgttct 240
aaccgctgt ctgcggaatt caccacc 267

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> линкер

<400> 60

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 61
<211> 89
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Библиотека TCL15 на tencon27 с рандомизированной поверхностью A-AB-B-BC-E

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (6) .. (6)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (8) .. (8)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (10) .. (11)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (13) .. (16)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (18) .. (18)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (20) .. (20)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (22) .. (22)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (55) .. (55)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (57) .. (57)
 <223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 61

Leu Pro Ala Pro Lys Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Ala Xaa Leu Xaa Trp Xaa Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
 20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Xaa Tyr Xaa Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 62
<211> 89
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Fibcon library with randomized C-CD-F-FG surface

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (32) .. (32)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (34) .. (34)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (36) .. (36)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (38) .. (41)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (68) .. (68)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (70) .. (70)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (72) .. (72)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (78) .. (79)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (81) .. (81)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 62

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

Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Xaa
20 25 30

Ile Xaa Tyr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr
35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly
50 55 60

Val Glu Tyr Xaa Val Xaa Leu Xaa Ala Leu Lys Asp Asn Xaa Xaa Ser
65 70 75 80

Xaa Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr
85

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность тяжа С каркаса TP1KR9P61-A2

<400> 63

Asp Ser Phe Ala Ile Glu Tyr Phe Glu
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность тяжа С клона TP1KR9P62-A2

<400> 64

Asp Ser Phe Ala Ile Glu Tyr Ser Glu
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность тяжа С клона TP1KR9P62-D4

<400> 65

Asp Ser Phe Gly Ile Ile Tyr Phe Glu
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность тяжа С клона TP1KR9P62-E3

<400> 66

Asp Ser Phe Gly Ile Glu Tyr Phe Glu
1 5

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля CD TP1KR9P61-A2

<400> 67

Asp Trp Trp Ser Gly Glu
1 5

<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля CD TP1KR9P62-A2

<400> 68

Asp Tyr Trp Leu Gly Glu
1 5

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля CD TP1KR9P62-D4

<400> 69

Asp Trp Trp Ala Gly Glu
1 5

<210> 70
<211> 6
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Петля CD TP1KR9P62-E3
 <400> 70
 Asp Tyr Trp Thr Gly Glu
 1 5

 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Тяж F TP1KR9P61-A2
 <400> 71
 Thr Glu Tyr Ala Val Ser Ile Arg Gly Val
 1 5 10

 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Тяж F TP1KR9P61-A7
 <400> 72
 Thr Glu Tyr Ser Val Ser Ile Arg Gly Val
 1 5 10

 <210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> TP1KR9P62-A2
 <400> 73
 Thr Glu Tyr Gly Val Ser Ile Arg Gly Val
 1 5 10

 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Тяж F TP1KR9P62-C3
 <400> 74
 Thr Glu Tyr Ser Val Thr Ile Arg Gly Val

1

5

10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля FG TP1KR9P61-A2

<400> 75

Lys Gly Gly Met Pro Ser Ala
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля FG TP1KR9P61-A7

<400> 76

Lys Gly Gly Tyr Pro Ser Ser
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля FG TP1KR9P61-E2

<400> 77

Lys Gly Gly Met Pro Ser Pro
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Петля FG TP1KR9P61-G4

<400> 78

Lys Gly Gly Tyr Pro Ser Ala
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-A2

<400> 79

Lys Gly Gly Tyr Pro Ser Pro
1 5

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-C3

<400> 80

Lys Gly Gly Pro Pro Ser Ser
1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-C6

<400> 81

Lys Gly Gly Tyr Pro Ser Ser
1 5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-D4

<400> 82

Lys Gly Gly Pro Pro Ser Arg
1 5

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-D8

<400> 83

Lys Gly Gly Leu Ala Ser Pro
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Петля FG TP1KR9P62-H10

<400> 84

Lys Gly Gly His Pro Ser Val
1 5

<210> 85
<211> 90
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P61-A2

<400> 85

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Met Pro
65 70 75 80

Ser Ala Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 86
<211> 90
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P61-A7

<400> 86

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20

25

30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ser Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Tyr Pro
 65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90

<210> 87

<211> 90

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P61-E2

<400> 87

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
 20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Met Pro
 65 70 75 80

Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90

<210> 88

<211> 90

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P61-G4

<400> 88

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp

1					5					10					15				
Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe				
			20				25						30						
Ala	Ile	Glu	Tyr	Phe	Glu	Asp	Trp	Trp	Ser	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu				
			35				40						45						
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro				
			50				55						60						
Gly	Thr	Glu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ile	Arg	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Tyr	Pro				
65					70							75			80				
Ser	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr										
				85			90												

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

<400> 90

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ser Val Thr Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Pro Pro
65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 91

<211> 90

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-C6

<400> 91

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Cys Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ser Val Thr Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Tyr Pro
65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 92

<211> 89

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-D3

<400> 92

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Ser Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Tyr Pro Ser
65 70 75 80

Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 93

<211> 90

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-D4

<400> 93

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Gly Ile Ile Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ala Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Gly Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Pro Pro
65 70 75 80

Ser Arg Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 94
<211> 90
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-D8

<400> 94

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Gly Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Leu Ala
65 70 75 80

Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 95
<211> 90
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-E3

<400> 95

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

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

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly Tyr Pro
65 70 75 80

Ser Ala Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 96

<211> 90

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> mIL-17A, связывающий каркас TP1KR9P62-H10

<400> 96

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30

Ala Ile Glu Tyr Phe Glu Asp Trp Trp Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ser Val Ser Ile Arg Gly Val Lys Gly Gly His Pro
65 70 75 80

Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 97

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 98
<211> 94
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Библиотека каркаса на основе FN10 с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (33) .. (33)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (35) .. (35)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (37) .. (37)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (39) .. (42)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (69) .. (69)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (71) .. (71)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (73) .. (73)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (83) .. (84)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (86) .. (86)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 98

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

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

<210> 99
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Библиотека каркаса на основе TN3 с рандомизированной поверхностью C-CD-F-FG

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (33) .. (33)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (35) .. (35)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (37) .. (40)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (67) .. (67)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (69) .. (69)
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> Прочие приложения
<222> (71)..(71)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (77)..(78)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (80)..(80)
<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 99

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

Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Xaa Leu
20 25 30

Xaa Tyr Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu
35 40 45

Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr
50 55 60

Glu Tyr Xaa Val Xaa Leu Xaa Ser Arg Arg Gly Asp Xaa Xaa Ser Xaa
65 70 75 80

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 100
<211> 270
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> кДНК, кодирующая tencon27

<400> 100
atgctgccgg cgccgaaaaa cctggttggt tctcgtgtta ccgaagactc tgcgcgtctg 60
tcttggaccg cgccggacgc ggcgttcgac tctttcctga tccagtagca ggaatctgaa 120
aaagttggtg aagcgatcgt tctgaccgtt ccgggttctg aacgttctta cgacctgacc 180
gggtctgaaac cgggtaccga atacaccgtt tctatctacg gtgttaaagg tggtcaccgt 240
tctaaccgcg tgtctgcat cttcaccacc 270

<210> 101
<211> 270
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> кДНК, кодирующая библиотеку TCL14

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (97)..(98)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (99)..(99)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (103)..(104)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (105)..(105)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (109)..(110)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (111)..(111)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (115)..(116)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (117)..(117)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (118)..(119)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (120)..(120)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (121)..(122)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения

<222> (123)..(123)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (124)..(125)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (126)..(126)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (205)..(206)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (207)..(207)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (211)..(212)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (213)..(213)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (217)..(218)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (219)..(219)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (235)..(236)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (237)..(237)
<223> s представляет собой с или g

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (238)..(239)
<223> n представляет собой а, с, g или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (240)..(240)
<223> s представляет собой с или g

<220>

<221> Прочие приложения
<222> (244) .. (245)
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>
<221> Прочие приложения
<222> (246) .. (246)
<223> s представляет собой с или g

<400> 101
atgctgccgg cgccgaaaaa cctgggttggt tctcgtgtta ccgaagactc tgcgcgtctg 60
tcttggaaccg cgccggacgc ggcgttcgac tctttcnnsa tcnnstacnn sgaannsnns 120
nnsnnsngtg aagcgatcgt tctgaccgtt ccgggttctg aacgttctta cgacctgacc 180
ggtctgaaac cgggtagcga atacnnshtt nnsatcnnsг gtgttaaagg tggtnnsnns 240
tctnnscgc tgtctgcgat cttcaccacc 270
1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения библиотеки доменов фибронектинового модуля типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, образованной бета-тяжем C, петлей CD, бета-тяжем F и петлей FG, содержащий

а. обеспечение эталонного полипептида домена FN3 с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27;

б. внесение разнообразия в эталонный полипептид домена FN3 путем мутации по меньшей мере одного остатка бета-тяжа C и по меньшей мере одного остатка бета-тяжа F для образования библиотеки домена FN3 с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG.

2. Способ по п. 1, в котором мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка бета-тяжа C и не мутирован остаток S30 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

3. Способ по п. 2, в котором мутированы остатки L32, Q34 и Q36 бета-тяжа C в соответствии с SEQ ID NO: 27.

4. Способ по п. 2, в котором мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка бета-тяжа F и не мутирован остаток E66 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

5. Способ по п. 4, в котором мутированы остатки T68, S70 и Y72 бета-тяжа F в соответствии с SEQ ID NO: 27.

6. Способ по п. 4, в котором мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка петли CD и не мутированы остатки G42 и E43 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

7. Способ по п. 6, в котором мутированы остатки S38, E39, K40 и V41 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

8. Способ по п. 4, в котором мутированы 1, 2, 3 или 4 остатка петли FG и не мутированы остатки K75, G76, G77 и S80 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

9. Способ по п. 8, в котором мутированы остатки H78, R79 и N81 в соответствии с SEQ ID NO: 27.

10. Способ по п. 9, в котором эталонный домен FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

11. Способ по п. 10, содержащий по меньшей мере одну

замену в положениях аминокислот 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86.

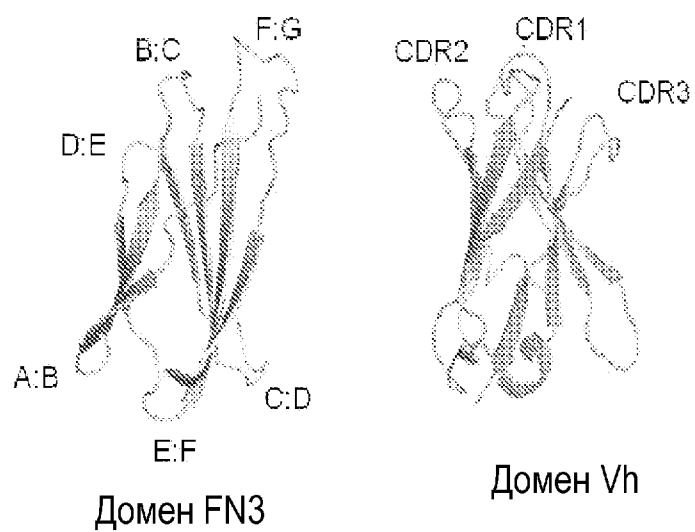
12. Библиотека, формируемая способом по п. 1.

13. Библиотека по п. 12, в которой библиотека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

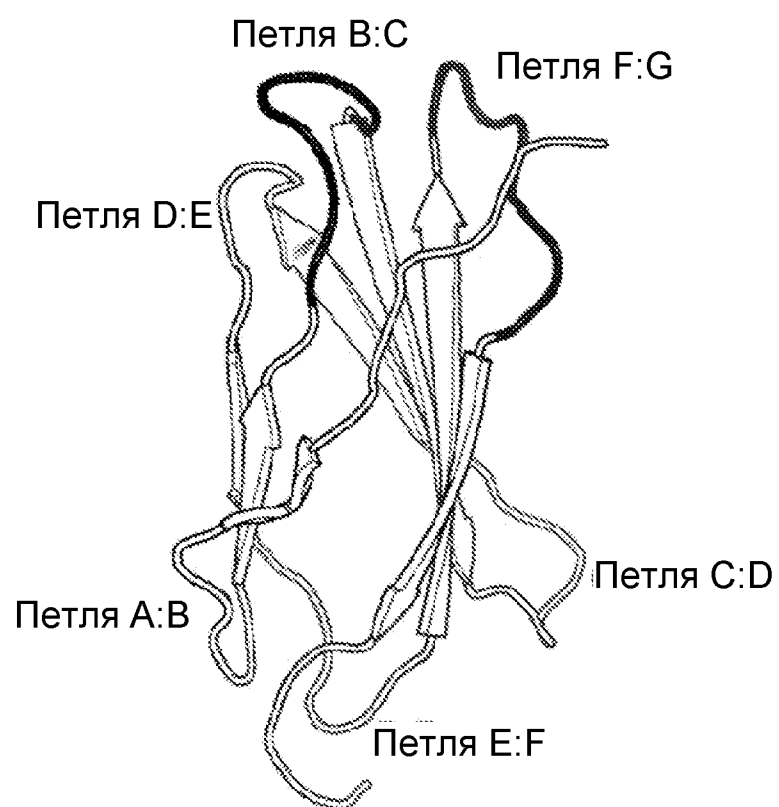
14. Способ получения белкового каркаса, содержащего домен фибронектинового модуля типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, которая может специфически связываться с молекулой-мишенью, содержащий приведение в контакт или пэннинг библиотеки по п. 12 с молекулой-мишенью и выделение белкового каркаса, который специфически связывается с молекулой-мишенью с заданной аффинностью.

По доверенности

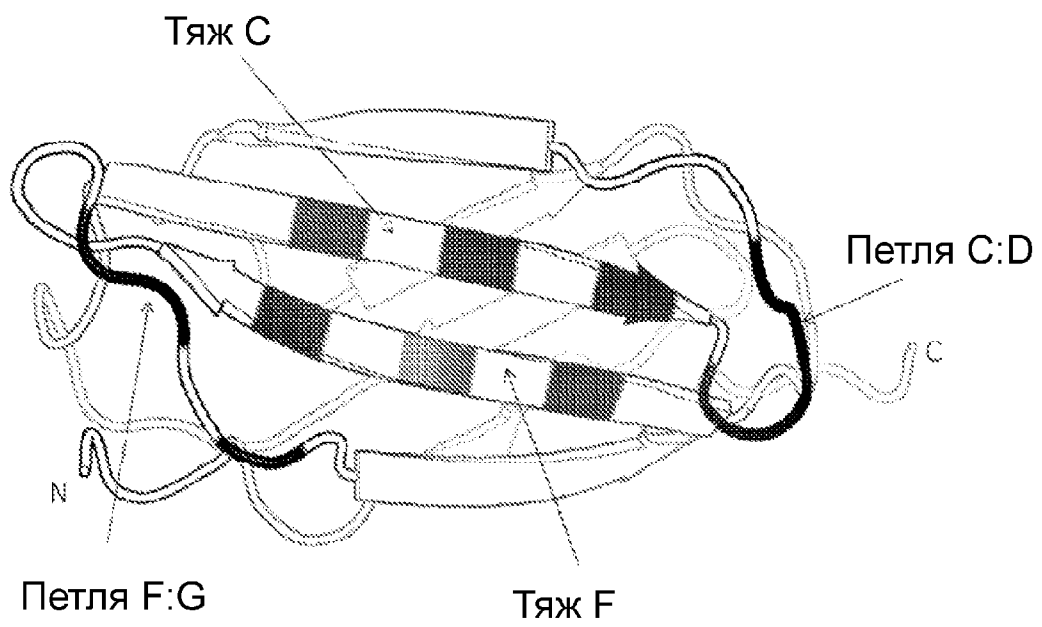
ФИГ. 1



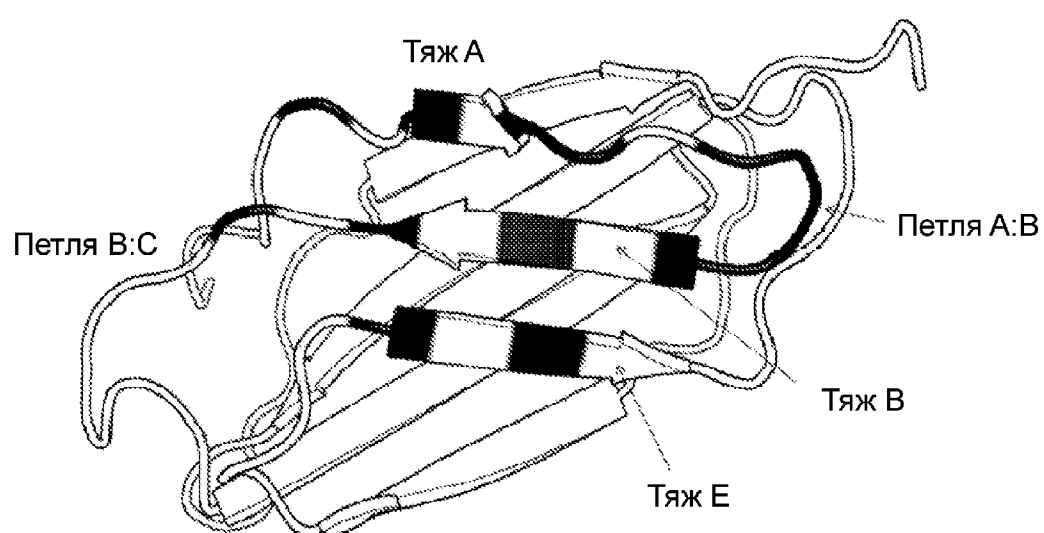
ФИГ. 2



ФИГ. 2В



ФИГ. 2С



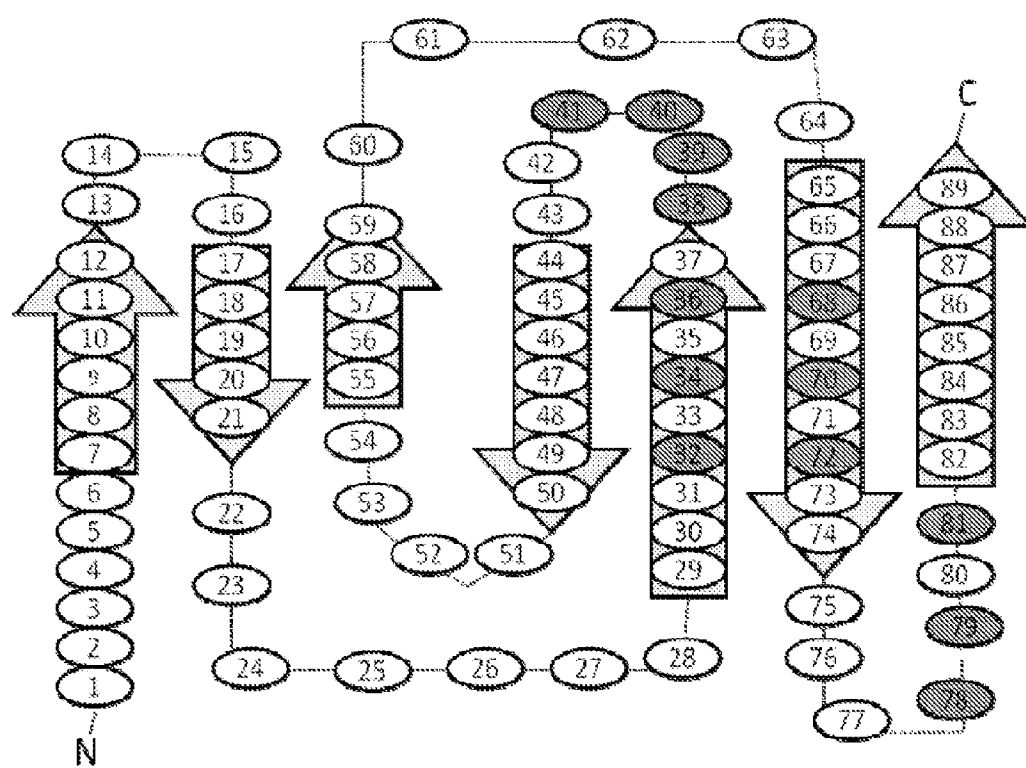
ФИГ. 3

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	SARLSW	TAPDAAF	DS (30)
TCL14	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	SARLSW	TAPDAAF	DS (30)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVG	EAI	VLTV	PGSER
						SYDLTG (60)
TCL14	(31)	FXIXYX	EXXX	XGE	AIV	LTVP
						PGSERSYDLTG (60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTV	SIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT (89)
TCL14	(61)	LKPGTEY	XVXIX	GVKGG	XSXS	PLSAIFTT (89)

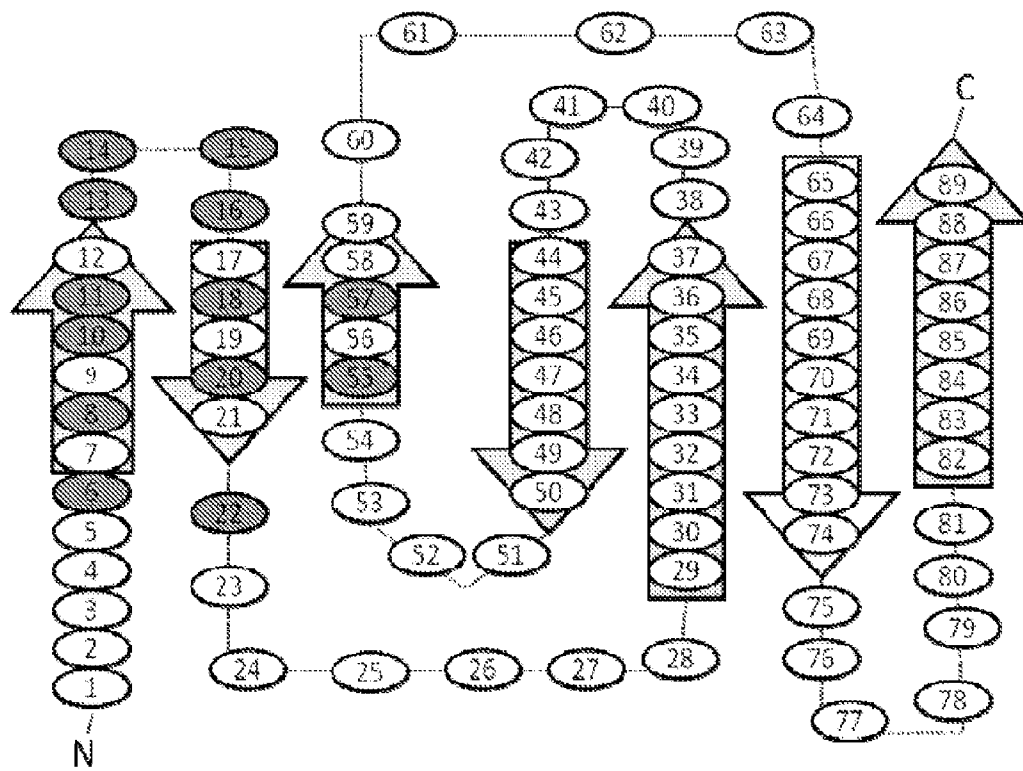
ФИГ. 4

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
TCL15	(1)	LPAPKXLXVXXVXXXXAXLXWX			APDAAFDS	(30)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (60)
TCL15	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVPGSER	XYX	LTG (60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL15	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT	(89)

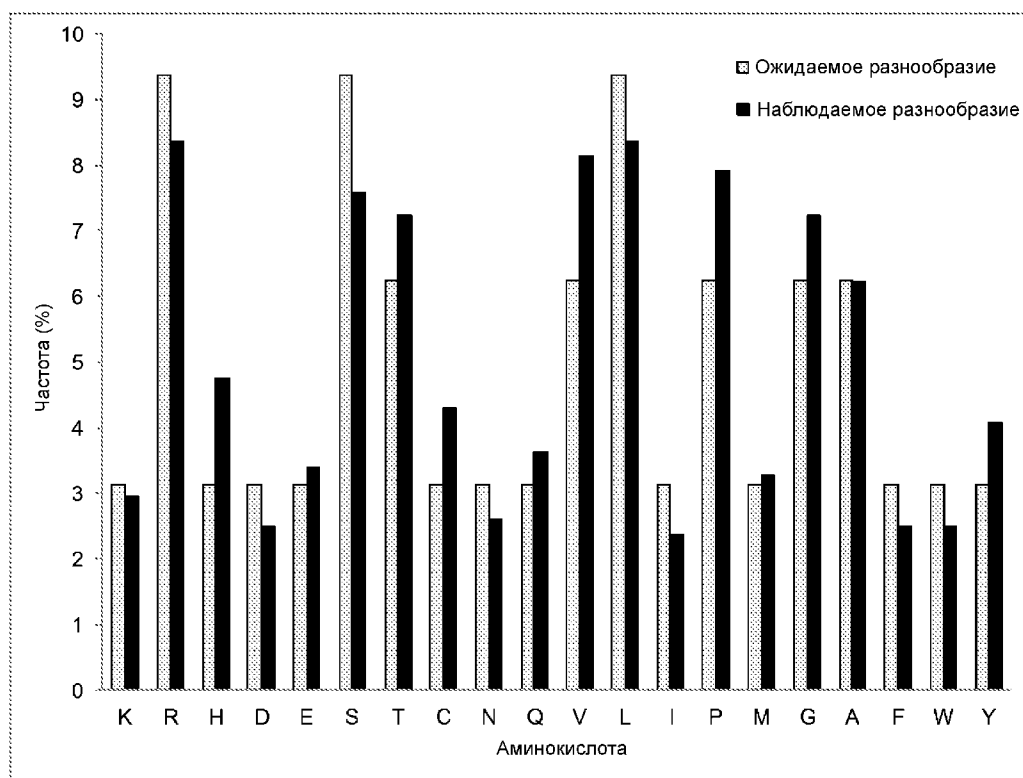
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



Фиг. 8

		A	AB	B	BC		
Tencon27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	SARLSW	TAPDAAF	DS (30)	
TCL14		-LPAPKNLVVSRV	TEDS	SARLSW	TAPDAAF	DS	
Fibcon		-LDAPTDLQVTNVT	DTSITV	SWTPPS	SATITG		
FN10		VSDVPRDLEVVAAT	PTSLLIS	WDAPAV	TVRY		
TN3		--DAPSQIEVKDV	TDTTALIT	WEKPLA	EIDG		
		. *	:: *	. *	:	:: *	* . .
		C	CD	D	DE	E	
Tencon27	(31)	FLIQYQE	SEKVG	E	AIVLTV	PGSERSYDLTG	(60)
TCL14		F	XIXYXXXXX	G	EAIVLTV	PGSERSYDLTG	
Fibcon		Y	XIXYXPXXXX	G	E	PKELTVPPSSTSVTITG	
FN10		Y	XIXYXXXXX	S	PVQEFTV	PGSKSTATISG	
TN3		I	XIXYXXXXX	G	DRTTIDL	TEDENQYSIGN	
		*	:: ***	*****	.	:	:: . . . :
		EF	F	FG	G		
Tencon27	(61)	LKPG	TEYTVSIYGV	KGG	HRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14		LKPGTEY	XVXIXGV	--KGG--	XXSX	PLSAIFTT	
Fibcon		LTPGVEY	XVXLXAL	--KDN--	XXSX	PLVGTQTT	
FN10		LKPGVDY	XIXVXAVT	GRGDSP	XXSX	PISINYRT	
TN3		LKPDTEY	XVXLXSR	--RGD--	XXSX	PAKETFTT	
		*	. *	. . . :	*	*	*