

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035150**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.05.06**

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

(21) Номер заявки  
**201490703**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.09.27**

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ КАРКАСОВ НА ОСНОВЕ  
ФИБРОНЕКТИНОВОГО ДОМЕНА ТИПА III С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ  
ПОВЕРХНОСТЯМИ СВЯЗЫВАНИЯ**

---

(31) **61/539,670**

(32) **2011.09.27**

(33) **US**

(43) **2014.09.30**

(86) **PCT/US2012/057436**

(87) **WO 2013/049275 2013.04.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

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

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

(56) **US-A1-20100216708**  
**US-A1-20090176654**

SIGGERS et al., Conformational dynamics in loop swap mutants of homologous fibronectin type III domains. *Biophys. J.*, 1 October 2007 (published online 25 May 2007), vol. 93, no. 7, p. 2447-56; pg. 2448, Fig 1

KOIDE et al., The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* December 1998, vol. 284, no. 4, p. 1141-51

OLSON et al., Design, expression, and stability of a diverse protein library based on the human fibronectin type III domain. *Protein Sci.*, March 2007, vol. 16, no. 3, p. 476-84

KOIDE et al., Teaching an old scaffold new tricks: monobodies constructed using alternative surfaces of the FN3 scaffold. *J. Mol. Biol.*, 13 January 2012 (published online 16 December 2011), vol. 415, no. 2, p. 393-405

(57) Изобретение относится к способу получения белкового каркаса, который специфично связывается с молекулой-мишенью. Способ включает приведение в контакт библиотеки фибронектиновых доменов типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, образованной бета-тяжем C, петлей CD, бета-тяжем F и петлей FG, с молекулой-мишенью с заданной аффинностью, где библиотека доменов FN3 с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG образована путем внесения мутаций в эталонный полипептид домена FN3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, где мутации включают остатки L32, Q34 и Q36 бета-тяжа C при условии, что S30 не мутирован, остатки T68, S70 и Y72 бета-тяжа F при условии, что не мутирован остаток E66, остатки S38, E39, K40 и V41 петли CD при условии, что не мутированы остатки G42 и E43, и остатки H78, R79 и N81 петли FG при условии, что не мутированы остатки K75, G76, G77 и S80, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27.

**B1****035150****035150 B1**

### Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения белковых каркасов на основе фибронектинового повтора типа III (FN3) с альтернативными конфигурациями поверхности связывания.

### 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).

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, Karatan et al., *Chem. Biol.*, 11, 835-844, 2004; Koide et al., *J. Mol. Biol.*, 284, 1141-1151, 1998; Koide et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 6632-6637, 2007; Parker et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 18, 435-444, 2005; Xu et al., *Chemistry & Biology*, 9, 933-942, 2002). Библиотеки доменов FN3 также были созданы путем рандомизации петель AB, EF и CD (публикация патента США № 2011/0038866; публикация международного патента № WO 2011/05133; публикация патента США № 2011/0124527). Другие ссылки на библиотеки FN3 включают в себя публикации международных патентов № WO 2002/32925, WO 2003/104418, WO 2009/023184 и WO 2010/060095. В публикации международного патента № WO 2012/016245 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

Настоящее изобретение представляет собой способ получения белкового каркаса, который специфически связывается с молекулой-мишенью, включающий приведение в контакт библиотеки фибронектиновых доменов типа III (FN3) 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 VH 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. 2A); В) библиотеку FN3 с рандомизированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG (библиотека TCL14) (фиг. 2B); С) библиотеку FN3 с рандомизированной поверхностью A-AB-B-BC-E (библиотека TCL15) (фиг. 2C). 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, цитоклиновые рецепторы и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 8990-8994, 1992; Meinke et al., J. Bacteriol. 175, 1910-1918, 1993; Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265, 15659-15665, 1990). 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 С и F и петлях CD и FG, и поверхность A-AB-B-BC-E, образованная аминокислотами в бета-тяжах А, В и Е и петле BC.

Применяемые в настоящем документе термины "замена", "замещенный", "мутация" или "мутированный" относятся к изменению, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательности полипептида или полинуклеотида для создания варианта этой последовательности.

Применяемые в настоящем документе термины "рандомизация", "рандомизированный", "диверсифицированный" или "диверсификация" относятся 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  $1 \times 10^{-6}$  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 тандемных 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 варибельных 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 вторыми, 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 иммуноглобулиноподобным 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; 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 табл. 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 низко.

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 определенном 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 тенастина 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 $\beta$ -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
$\beta$ -цепь рецептора интерферона- $\gamma$	2
$\beta$ -цепь интерлейкина-12	1
$\beta$ -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 тенастин	15
Рецептор тромбopoэтина	2
Рецептор тирозинпротеинкиназы Tie-1	3

В табл. 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 тенасцина 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, 2А). 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° (фиг. 2В, 2С). 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 E и петлей АВ и ВС и в настоящем документе называется поверхностью А-АВ-В-BC-E.

Альтернативные поверхности в доменах FN3 в каждом домене FN3 кодируются несмежными фрагментами аминокислот. Например, как показано в табл. 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-BC-E 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 табл. 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 DSFLIQYQESEKVG (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 табл. 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: 4 4; 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 С-CD-F-FG Tencon27 (SEQ ID NO: 27) имеет четыре открытых на поверхности остатка в бета-тяже С (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.). 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 поло-

жениям аминокислотных остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86.

В отношении потери стабильности, "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 (°C), при которой  $1/2$  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 (CH<sub>3</sub>COOH), 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 флюоресценции 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), Tенcon (SEQ ID NO: 16), Tенcon27 (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 Tенcon27, показаны в табл. 2 и на фиг. 8 и идентичны линейной последовательности Tенcon, 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 литера-

type (Hallewell et al., J. Biol. Chem. 264, 5260-5268, 1989 г.; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995.; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; 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).

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, мирилат, 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 Tenson (SEQ ID NO: 16) или его варианты, как показано в SEQ ID NO: 17-26 и в табл. 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 патентах США № 6521427 и 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).

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). 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 (Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296, 57-86, 1999; Garrard & Henner, *Gene*, 128, 103-109, 1993). 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 C, S38, E39, K40 и V41 петли CD, T68, S70 и Y72 бета-тяжа F и H78, R79 и N81 в петле FG домена FN3 Tenson27 (SEQ ID NO: 27) рандомизируют кодоном NNS.

Применяют стандартные методики клонирования и экспрессии для клонирования библиотек в вектор или синтеза кассет с двухцепочечной кДНК библиотеки, чтобы затем экспрессировать библиотеки или транскрибировать их *in vitro*. Например, можно применять цис-дисплей для лигирования 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 ассоции-

руется с кодирующей его ДНК (патент США № 7842476; Odegrip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2806-2810, 2004). Можно применять другие способы, например рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4937-4942, 1997), мРНК-дисплей (Roberts and Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12297-12302, 1997) 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 № WO 2009/085462; патенты США № 6969108; 6172197; 5223409; 6582915; 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. USA, 101, 2806-2810, 2004, 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, иммуоферментный сэндвич-анализ и конкурентный и неконкурентный анализы (см., например, Ausubel et al., eds, 1994, 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  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$  или  $10^{-15}$  М, по результатам измерения с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса или способом Кинеха, 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); Kubly, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, NY (1992); 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 некодирующую 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 герA, 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); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может происходить от млекопитающего или может быть выбрана из клеток COS-1, COS-7, HEK293, ВНК21, CHO, BSC-1, Hep 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, адьюванту, 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, 21<sup>st</sup> 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 внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное, подкожное, легочное; чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравлагинальное, 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 транскрипцию 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 His<sub>6</sub> 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/мин в калориметре N-DSCII (Applied Thermodynamics). Исходя из этих данных, с помощью программного обеспечения CpCalc (Applied Thermodynamics) рассчитали температуры плавления 54 и 78°C для домена TN3 и Tenson соответствен-

но. 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 № WO 2008/079973) с помощью стандартного ПЦР и клонирования фрагментов рестрикции, позволяя получить вектор pTenson-rIX. Этот вектор экспрессирует меченный Мус на N-конце Tenson в виде слияния по C-концу с N-концом белка rIX бактериофага M13 под контролем промотора Lac (позволяя получить более низкие уровни экспрессии без IPTG и повышенную экспрессию после добавления IPTG), используя сигнальную последовательность OmpA. Между Tenson и rIX вставили короткий линкер TSGGGGS (SEQ ID NO: 60) для предотвращения стерических взаимодействий между этими белками.

Для подтверждения отображения на поверхности частицы фага M13 выращивали трансформанты pTenson-rIX из одной колонии в XL1-Blue E.coli при температуре 37°C до достижения середины логарифмического роста и спасали с помощью 6<sup>10</sup> БОЕ фага-помощника VCSM13. Через 16 ч размножения в среде 2YT с добавлением ампициллина с последующей индукцией 1 mM IPTG со спасенных культур собирали супернатанты, центрифугировали их при 4000 X g в течение 20 мин и хранили при 4°C для анализа.

Чтобы подтвердить отображение конструктора Мус-Tenson на поверхности фага M13, 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- $\alpha$ v (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-M13 HRP и промывали TBST после 1-часовой инкубации. Добавляли субстрат Roche BD ELISA POD и обнаруживали люминесценцию на спектрофотометре для прочтения планшетов Tesap.

Пример 2. Стабилизирующие мутации в Tenson.

Были описаны библиотеки Tenson 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 Tenson (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). Ранее было обнаружено, что мутант E86I (Tencon22; SEQ ID NO: 22) стабилизирует гомологичный белок, 3-й домен FN3 тенацина С человека (WO 2009/086116). В экспериментах с аланиновым сканированием, в которых все остатки петли Tenson независимо заменяли на аланин, было обнаружено, что мутация L17A (Tencon26; SEQ ID NO: 26) значительно стабилизирует Tenson (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 Tenson последовательности проводили с применением набора для мутагеназа QuikChange (Stratagene) и мутантные белки экспрессировали и очищали с применением стандартных протоколов в виде слитых белков HIS<sub>6</sub>. 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 Tenson 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 до 95°C или 100°C со скоростью 1°C/мин. Между сканированием каждого образца проводили сканирование только буферного раствора для расчета базовой линии для интегрирования. После вычитания сигнала только от буферного раствора данные аппрок-

смирировали 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 первом сканировании и при втором сканировании. Результаты экспериментов с DSC представлены в табл. 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 ч считывали флуоресценцию на спектрофотометре для прочтения планшетов Spectramax M5 (Molecular Devices, г. Саннивейл, 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):

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

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):

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

где F - флуоресценция при заданной концентрации денатурирующего агента;

$\alpha_N$   $\alpha_D$  - отсечения оси y для нативного и денатурированного состояния;

$\beta_N$   $\beta_D$  - 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;

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):

$$\Delta G = m[D]_{50\%}.$$

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 Tencon. 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 табл. 3. Результаты экспериментов по разворачиванию GdmCl показывают, что те же мутанты, которые стабилизируют Tencon в отношении термостабильности, также стабилизируют белок относительно индуцируемой GdmCl денатурации.

Таблица 3

Конструкт	Мутации	T <sub>m</sub> (ккал)	[D] <sub>50%</sub> (M)	DG (H <sub>2</sub> 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 инжестрировали 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 тестируемые образцы, за исключением Tencon21, элюировались одним пиком при объеме элюирования, соответствующем мономерному образцу. Tencon21 элюировался двумя 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. USA, 104, 6632-6637, 2007). Напротив, было обнаружено, что у каркасного белка на основе повтора анкирина, выбранного для связывания с MBP, была значительно более плоская поверхность взаимодействия, при этом он связывался с внешней поверхностью MBP, которая удалена от активного сайта (Binz et al., Nat. Biotechnol., 22, 575-58, 2004). 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.

Tencon 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 Tencon, представленной на фиг. 1, на 90° 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. 2B, 3). Положения петель и тяжей и их последовательности показаны в табл. 4 и табл. 5 для Tencon27 (SEQ ID NO: 27) и TCL14 (SEQ ID NO: 28) соответственно. В табл. 5 "X" обозначает любую аминокислоту.

Tencon27 (SEQ ID NO: 27):

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDL

TGLKPGTEYTVSIIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO: 28):

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYXEXXXXXGEAIVLTVPGSERSYDL

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 E	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; Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 6632-6637, 2007; (Dineen et al., BMC Cancer, 8, 352-361, 2008; Olson and Roberts, Protein Sci, 16, 476-484, 2007; Xu et al., Chemistry & Biology, 9, 933-942, 2002; Karatan et al., Chem Biol, 11, 835-844, 2004; Hackel et al., J. Mol. Biol., 401, 84-96, 2010; Hackel et al., J Mol Biol 381, 1238-1252, 2008; Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 6632-6637, 2007; Lipovsek et al., J. Mol. Biol., 368, 1024-1041, 2007; публикация международного патента № WO 2009/133208; публикация международного патента № WO 2009/058379; патент США № 7115396), поверхность разработанной библиотеки TCL14 не имеет структурного сходства с вариабельными 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.



как белки, меченные His6 на С-конце, после трансформаций и индукции IPTG (конечная концентрация 1 мМ, 30°C в течение 16 ч), 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 клонх 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 вырожденном 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 инъектирования 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 монодисперсный профиль, применяли дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC). Данные DSC получали путем нагрева растворов 0,5 мг/мл для каждого клона в ФСБ с 35 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 табл. 7. Средняя температура плавления тестируемых 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 <sub>m</sub> (°C)	Номер клона	T <sub>m</sub> (°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% БСА (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 мин, продолжительность захвата на гранулы снизили с 20 мин до 15 мин, 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 His<sub>6</sub> слитых белков TCL14-RepA или контрольный белок (сывороточный альбумин человека), нанесли на лунки покрытых планшетов. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, 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 табл. 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 мышинный IL-17A.

Ингибирование рецепторов IL-17A.

Провели анализ ингибирования для определения того, ингибируют ли выходы пэннинга на мышинный 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 мин. 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 % ингибиро-

вания. Процент ингибирования для связывания mIL-17A с рецептором mIL-17 определяли как 100 - (образец/отрицательный контроль × 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 IC<sub>50</sub>, применяя сигмоидальную аппроксимацию кривой зависимости ответа от дозы. Как показано в табл. 9, специфические ингибиторы mIL-17A имеют значения IC<sub>50</sub> в диапазоне от ~9 до ~428 пМ.

Таблица 9

Идентификационный номер клона	IC <sub>50</sub> (пМ)	k <sub>on</sub> (1/Мс)	k <sub>off</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (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 мин. 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 ч, в зависимости от их скорости диссоциации, при скорости потока 100 мкл/мин. Для контроля стабильности базовой линии инжестировали 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<sub>on</sub>, k<sub>off</sub>) констант и константы аффинности (K<sub>D</sub>). Как показано в табл. 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 табл. 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	DSFGIYFE	65	DWWAGE	69
TP1KR9P62-D8	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67
TP1KR9P62-E3	DSFGIYFE	66	DYWTGE	70
TP1KR9P62-H10	DSFAEYFE	63	DWWSGE	67

Идентификационный номер клона	Тяж F		Петля FG	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	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 Tenson27, рандомизированные по второй альтернативной поверхности.

Вторая альтернативная поверхность на Tenson27 находится с противоположной стороны от поверхности C-CD-F-FG, как показано в визуализации на фиг. 2С, и в настоящем документе называется поверхностью А-АВ-В-ВС-Е, причем она образована бета-тяжем А, петлей АВ, бета-тяжем В, петлей ВС и бета-тяжем Е. Поверхность А-АВ-В-ВС-Е 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 Tenson27 стабильности. Рандомизация поверхности А-АВ-В-ВС-Е позволит получить поверхность связывания на противоположной стороне структуры Tenson27 в сравнении с конфигурацией библиотеки TCL14. Конфигурация библиотеки на основе Tenson27 с рандомизированной поверхностью А-АВ-В-ВС-Е показана в SEQ ID NO: 61 (библиотека TCL15) и на фиг. 6.

Библиотека TCL15 (SEQ ID NO: 61):

LPAPKXLLXVXXVXXXXAXLXWXAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEI VLTVPGSERXYXL

TGLKPGTEYTVS IYGVKGGHRSNPLSAI FTT ;

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 Tenson27, можно применить для других доменов FN3 различных белков вследствие струк-

турного 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 табл. 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):

VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAVTVRYXIXYXEXXXSPVQEFVPGSKSTAT

ISG LKPGVDYXIXVXAVTGRGDSPPXSXPISINYRT;

где X представляет собой любую аминокислоту.

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

DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIXLXYIXXXXGDRTTIDLTE DENQYSIG

NLKPDT EYXVXLXSRRGDXXSXPAKETFTT;

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.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

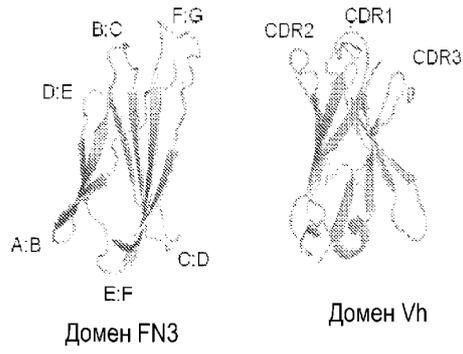
1. Способ получения белкового каркаса, который специфично связывается с молекулой-мишенью, включающий:

а) приведение в контакт библиотеки фибронектиновых доменов типа III (FN3) с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG, образованной бета-тяжем С, петлей CD, бета-тяжем F и петлей FG, с молекулой-мишенью;

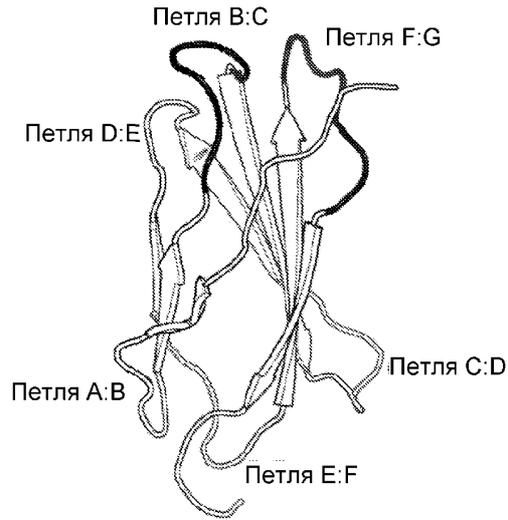
б) выделение белкового каркаса, который специфично связывается с молекулой-мишенью с заданной аффинностью, где библиотека доменов FN3 с диверсифицированной альтернативной поверхностью C-CD-F-FG образована путем внесения мутаций в эталонный полипептид домена FN3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, где мутации включают остатки L32, Q34 и Q36 бета-тяжа С при условии, что S30 не мутирован, остатки T68, S70 и Y72 бета-тяжа F при условии, что не мутирован остаток E66, остатки S38, E39, K40 и V41 петли CD при условии, что не мутированы остатки G42 и E43; и остатки H78, R79 и N81 петли FG при условии, что не мутированы остатки K75, G76, G77 и S80, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 27.

2. Способ по п.1, в котором эталонный полипептид домена FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, содержащую по меньшей мере одну замену в положениях аминокислот 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86.

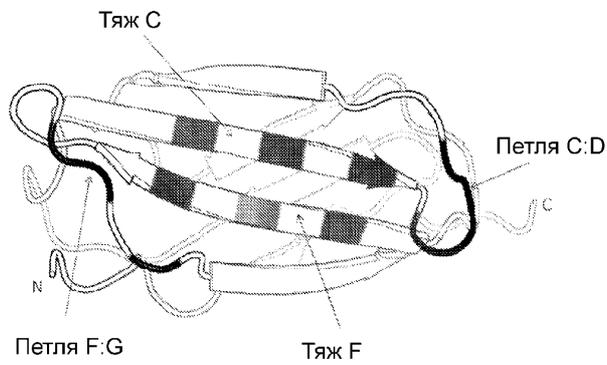
3. Способ по п.2, где эталонный полипептид домена FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.



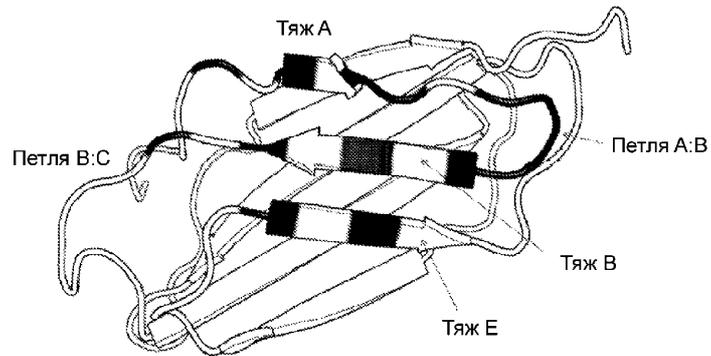
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 2В



Фиг. 2С

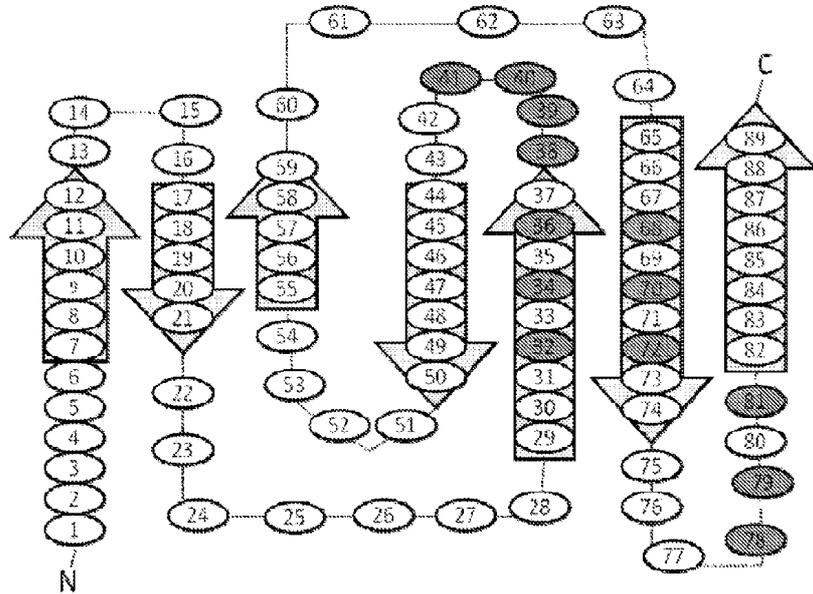
035150

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (3C)
TC114	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (3C)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (6C)
TC114	(31)	FXIXYXEXXX	XGEAIVLTV	PGSERSYDLTG		(6C)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVS	IYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT (89)
TC114	(61)	LKPG	TEYTVS	IYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT (89)

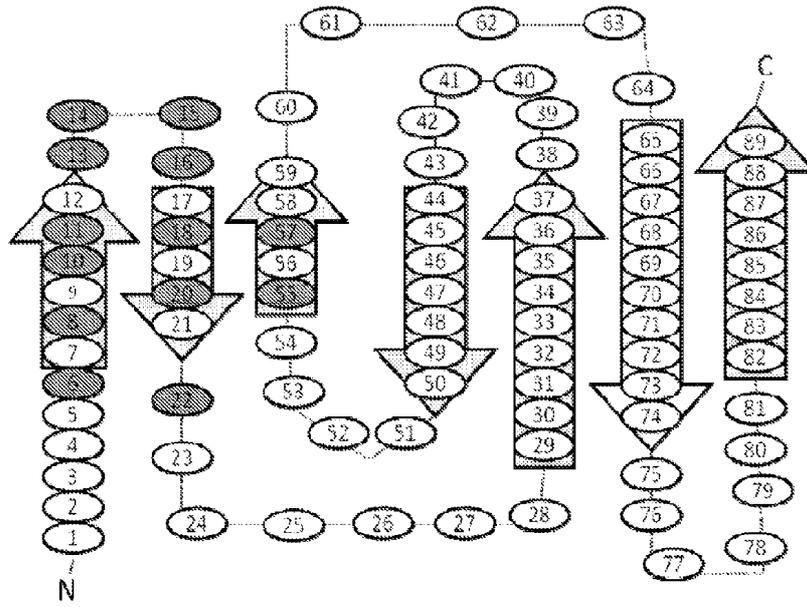
Фиг. 3

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (3C)
TC115	(1)	LPAPKXLVXXV	XXXXXAXL	XWXP	DAAF	DS (3C)
		C	CD	D	DE	E
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLTG (6C)
TC115	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	PGSER	XYXLTG (6C)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPG	TEYTVS	IYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT (89)
TC115	(61)	LKPG	TEYTVS	IYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT (89)

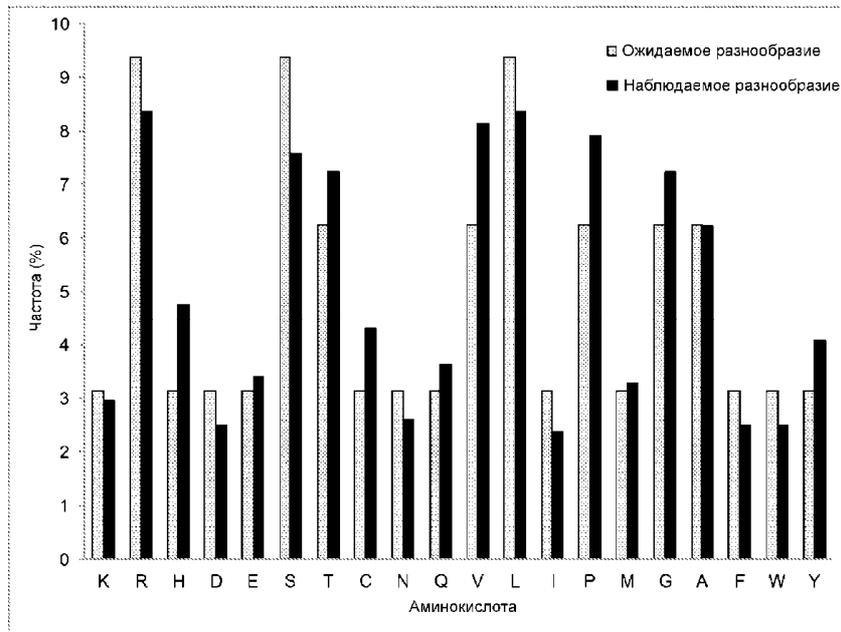
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

035150

		A	AB	B	BC	
Tencon27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS (30)
TCL14		-LPAPKNLVVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAF	DS
Fibcon		-LDAPTDLQVTNVT	DTS	TVSWT	PPSATITG	
FN10		VSDVPRDLEVVAAT	P	T	SLLISWD	DAPAVTVRY
TN3		--DAPSQIEVKDVT	D	T	TALITW	FKPLAEIDG
		.*	::	*	.*	: : : * . . .

		C	CD	D	DE	E	
Tencon27	(31)	FLIQYQE	SEKVGE	AIVLTVP	GSER	SYDLT	S (60)
TCL14		F	X	X	X	X	X
Fibcon		Y	X	X	X	X	X
FN10		Y	X	X	X	X	X
TN3		I	X	X	X	X	X
		*	::	*	::	*	::

		EF	F	FG	G	
Tencon27	(61)	LKPGTEYTVSIYGV	KGG	HRSN	PLSAIFTT	(89)
TCL14		LKPGTEY	X	X	X	X
Fibcon		LTPGVEY	X	X	X	X
FN10		LKPGVDY	X	X	X	X
TN3		LKPDTEY	X	X	X	X
		*	::	*	::	*

Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2