

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041577**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.09

(21) Номер заявки
201892796

(22) Дата подачи заявки
2017.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/38* (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)

**(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ДОМЕНЫ
ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III**

(31) 62/345,190

(32) 2016.06.03

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/035442

(87) WO 2017/210425 2017.12.07

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

(72) Изобретатель:
**Дим Майкл, Джекобс Стивен, О'Нил
Карин, Руткоски Томас (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Кузнецова Т.В., Соколов Р.А. (RU)**

(56) US-A1-20160041182
WO-A1-2015143199
WO-A2-2010051274
US-A1-20150210756
US-A1-20150152147

(57) Домены фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с сывороточным альбумином, имеющие к ним отношение полинуклеотиды, способные кодировать специфические в отношении сывороточного альбумина домены FN3, клетки, экспрессирующие домены FN3, а также ассоциированные векторы, помеченные детектируемым образом домены FN3 и домены FN3, слитые с гетерологичной составляющей, полезны для продления периода полужизни молекул при диагностических и терапевтических применениях.

B1**041577****041577****B1**

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и таким образом включен посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 31 мая 2017 года, называется JBI5089WOPCT.txt и имеет размер 49228 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к доменам фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с сывороточным альбумином. Такие домены FN3 могут использоваться, например, для удлинения *in vivo* периода полужизни в сыворотке лекарственных средств или белков, конъюгированных с ними. Также предоставляются способы получения таких молекул и фармацевтические композиции, содержащие их.

Предпосылки создания изобретения

Быстрая элиминация биотерапевтических молекул из кровотока может стать одной из причин ограниченной клинической эффективности этих молекул или приводить к более частому введению доз пациенту. Одним из часто встречающихся способов элиминации является почечный клиренс благодаря клубочковой фильтрации. Этот путь элиминации больше всего ассоциируется с более маленькими биотерапевтическими средствами, поскольку скорость фильтрации в почках значительно снижается в случае молекул с молекулярной массой, превышающей 50000 Да (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 2011). Некоторые одобренные биотерапевтические средства содержат активные части, которые сами по себе уменьшаются до значений ниже предела фильтрации и поэтому быстро выводятся. Чтобы преодолеть это ограничение, был введен ряд технологий для эффективного увеличения размера терапевтической молекулы для уменьшения фильтрации в почках.

Было установлено, что модификация терапевтических белков с добавлением человеческого сывороточного альбумина (HSA) является эффективным способом увеличения гидродинамического радиуса белка и уменьшения клубочковой фильтрации. HSA проявляет длительный период полужизни *in vivo* благодаря FcRn-опосредованному кругообороту, и HSA, с концентрацией приблизительно 40 г/л, является наиболее распространенным белком, обнаруживаемым в крови. FcRn-опосредованный кругооборот приводит к длительному периоду полужизни, составляющему приблизительно 19 дней, у людей. Кроме того, исследования биораспределения показывают, что альбумин может размещаться в организме в областях, важных для поражения заболевания, таких как воспаленные суставы или опухоли (Wunder, Muller-Ladner, Stelzer, Funk, Neumann, Stehle, Pap, Sinn, GayandFiehn, J Immunol 170:4793-4801 2003). Таким образом, период полужизни в сыворотке ряда белков был увеличен путем продукции их в виде C-концевых или N-концевых слияний с HSA. Успешные слияния включают интерферон альфа (Flisiak and Flisiak, Expert Opin Biol Ther 10:1509-1515 2010), гормон роста человека (Osborn, Sekut, Corcoran, Poortman, Sturm, Chen, Mather, Lin and Parry, Eur J Pharmacol 456:149-158 2002), фактор некроза опухолей (Metzner, Weimer, Kronthaler, Lang and Schulte, Thromb Haemost 102:634-644 2009), фактор свертывания крови IX (Metzner, Weimer, Kronthaler, Lang and Schulte, Thromb Haemost 102: 634-644 2009), фактор свертывания крови VIIa (Schulte, Thromb Res 122 Suppl 4: S14-19 2008), инсулин (Duttaroy, Kanakaraaj, Osborn, Schneider, Pickeral, Chen, Zhang, Kaithamana, Singh, Schulingkamp, Crossan, Bock, Kaufman, Reavey, Carey-Barber, Krishnan, Garcia, Murphy, Siskind, McLean, Cheng, Ruben, Birse and Blondel, Diabetes 54:251-258 2005), урокиназу (Breton, Pezzi, Molinari, Bonomini, Lansen, Gonzalez De Buitrago and Prieto, Eur J Biochem 231:563-569 1995), гирудин (Sheffield, Smith, Syed and Bhakta, Blood Coagul Fibrinolysis 12:433-443 2001), и фрагменты биспецифического антитела (Muller, Karle, Meissburger, Hofig, Stork and Kontermann, J Biol Chem 282: 12650-12 660 2007), среди прочих. Слитые с HSA белки могут иметь длительные периоды полужизни в сыворотке, однако крупномасштабная продукция таких слитых белков ограничивается системами экспрессии в эукариотических клетках. Кроме того, большой размер HSA может привести к потере активности терапевтического средства из-за пространственных затруднений.

Альтернативный способ, позволяющий использовать преимущества длительного периода полужизни в сыворотке альбумина, заключается в получении терапевтических белков в виде слияний с пептидами или белковыми доменами, которые связываются с сывороточным альбумином в крови. Эти молекулы могут быть отобраны для связывания с альбумином с различным сродством, что позволяет слитому белку ассоциироваться с альбумином и диссоциировать от него с заданными скоростями и временем пребывания *in vivo*. Например, фаговый дисплей был использован для отбора ряда пептидов с ограниченной конформационной свободой цистеинов, которые связываются с альбуминами различных видов. Экспрессия Fab-фрагмента антитела в виде слияния с этим пептидом значительно увеличивала период полужизни Fab в сыворотке мышей и кроликов (Dennis, Zhang, Meng, Kadkhodayan, Kirchhofer, Combs and Damico, J Biol Chem 277:35035-35043 2002) (US 20040253247 A1). Последующие исследования показали, что слияние этого пептида с фрагментом антитела приводит к лучшему максимальному накоплению в опухоли и более гомогенному распределению в опухоли по сравнению с молекулами Fab и mAb (mAb), нацеленными на тот же антиген (Dennis, Jin, Dugger, Yang, McFarland, Ogasawara, Williams, Cole, Ross and Schwall, Cancer Res 67:254-261 2007) (US 20050287153 A1). Ряд фрагментов антител, которые специфически связываются с альбумином, были отобраны аналогичным образом. V_{HH}-фрагмент антитела семейства верблюдовых (нанотело), который связывается с HSA, был слит с другим нанотелом, которое связывается с

TNF-альфа. Период полужизни этой молекулы в сыворотке был продлен с 54 мин до 2,2 дней у мышей, и эта молекула продемонстрировала накопление в воспаленных суставах и эффективность в модели ревматоидного артрита на мыши (Coppieters, Dreier, Silence, deHaard, Lauwereys, Casteels, Beirnaert, Jonckheere, VandeWiele, Staelens, Hostens, Revets, Remaut, Elewaut and Rottiers, *Arthritis Rheum* 54:1856-1866 2006). То же альбуминсвязывающее нанотело было слито с направленными против EGFR нанотелами, что привело к увеличению периода полужизни и лучшему накоплению в опухоли в моделях ксенотрансплантата (Tijink, Laeremans, Budde, Stigter-vanWalsum, Dreier, deHaard, Leemans and van Dongen, *Mol Cancer Ther* 7:2288-2297 2008). Аналогичным образом были сконструированы антитела против альбуминового домена (dAb), которые связываются с альбумином. Слияние этих dAb с рецептором интерлейкина-1 увеличивало время полужизни у крыс с 2 мин до 4,3 ч (Holt, Basran, Jones, Chorlton, Jespers, Brewis and Tomlinson, *Protein Eng Des Sel* 21:283-288 2008). Эта технология также была применена к слияниям с интерфероном альфа 2b (Walker, Dunlevy, Rycroft, Topley, Holt, Herbert, Davies, Cook, Holmes, Jespers and Herring, *Protein Eng Des Sel* 23:271-278 2010). Аналогичным образом, встречающиеся в природе альбуминсвязывающие домены из бактерий, обладающие сродством к альбумину, были использованы для продления периода полужизни *in vivo* (Anderson et al. 2011, Orlova et al., 2013, Malm et al., 2014). Jacobs и др. недавно описали консенсусный сконструированный альбуминсвязывающий домен и продемонстрировали возможность настройки профиля экспозиции в сыворотке на основе сродства к альбумину (Jacobs, Gibbs, Conk, Yi, Maguire, Kane, O'Neil, *Protein Eng Des Sel* 10:385-93, 2015). Несмотря на их применимость в качестве инструментов для исследования, применимость таких происходящих из бактерий доменов для терапевтических применений может быть ограничена из-за их иммуногенного потенциала и выведения лекарственных средств с помощью получающихся антител.

Таким образом, существует потребность в связывающихся с сывороточным альбумином молекулах, которые могут увеличить период полужизни терапевтических средств в сыворотке, которые могут обладать желаемыми биофизическими свойствами (например, быть по существу мономерными, хорошо свернутыми и т.д.), которые могут быть продуцированы экономически эффективным способом, и которые являются достаточно маленькими для допуска проникновения в ткани.

Краткое изложение сущности настоящего изобретения

Настоящее изобретение включает связывающиеся с сывороточным альбумином домены фибронектина типа III (FN3). Также описаны имеющие отношение к ним полинуклеотиды, способные кодировать предоставленные домены FN3, клетки, экспрессирующие предоставленные домены FN3, а также ассоциированные векторы. Кроме того, описаны способы применения предоставленных доменов FN3. Например, учитывая продленный период полужизни альбумина в сыворотке, альбуминсвязывающие пептиды формируют идеальных партнеров по слиянию для создания терапевтических белков с длительными периодами полужизни в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает выделенный домен FN3, причем домен FN3 связывается с доменом I или III человеческого сывороточного альбумина, и причем период полужизни в сыворотке домена FN3 превышает по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tencon SEQ ID NO: 67. В других вариантах осуществления альбумин-специфические домены FN3 связываются с альбумином сыворотки человека и альбумином сыворотки яванского макака. В еще одних вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 основан на последовательности Tencon SEQ ID NO: 1. В дальнейших вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 основан на последовательности Tencon27 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 основан на SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4, необязательно содержащей замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 и/или 86. В некоторых вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 выделен из библиотеки, включающей последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 7 или 8.

В некоторых вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 включает аминокислотную последовательность, модифицированную в С-цепи, CD-петле, F-цепи и FG-петле относительно последовательности Tencon SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 включает аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51-53. В некоторых вариантах осуществления альбумин-специфический домен FN3 имеет период полужизни в сыворотке, составляющий по крайней мере приблизительно 25 ч у яванских макаков.

В дополнение к описанным альбумин-специфическим доменам FN3, также предоставлены полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также предоставлены векторы, включающие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие альбумин-специфические домены FN3, описанные здесь. Также описаны клетки, способные к экспрессии раскрытых векторов. Эти клетки могут быть клетками млекопитающих (такими как клетки 293F, клетки CHO), клетками насекомых (такими как клетки S17), дрожжевыми клетками, клетками растений или клетками бактерий (такими как *E. coli*). Также предоставляется способ получения описанных доменов FN3.

Настоящее изобретение также включает способы слияния или иного связывания описанных альбу-

мин-специфических доменов FN3 с различными молекулами для продления периода полужизни таких молекул. Например, продленный период полужизни в сыворотке сывороточного альбумина делает его идеальным партнером по слиянию для создания терапевтических белков с длительными периодами полужизни в сыворотке. Как таковые, альбумин-специфические домены FN3 полезны для продления периодов полужизни терапевтических средств.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию, содержащую альбумин-специфический домен FN3, вводят для того, чтобы увеличить период полужизни *in vivo* терапевтического партнера. Такое увеличение периода полужизни может быть проанализировано различными способами, известными в данной области техники, включая, например, мониторинг фармакокинетики альбумин-связывающего домена FN3. Конкретные анализы для этих способов приведены в примерах.

В пределах объема настоящего изобретения находятся наборы, включающие раскрытые альбумин-специфические (связывающие) домены FN3. Наборы могут использоваться для осуществления способов применения альбумин-специфических доменов FN3, предоставленных здесь, или других способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать домены FN3, описанные здесь, и реагенты для применения при обнаружении присутствия человеческого сывороточного альбумина в биологическом образце. Описанные наборы могут включать один или более доменов FN3, описанных здесь, и емкость для хранения доменов FN3, когда они не используются, инструкции по использованию доменов FN3, прикрепленные к неподвижной опоре, и/или помеченные детектируемым образом формы доменов FN3, как здесь описано.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено не прямое извлечение эндогенного альбумина из сыворотки яванского макака и человека с использованием альбуминсвязывающих доменов FN3. Домены FN3, которые связываются с доменом 1 альбумина, заключены в рамки с использованием пунктирных линий; домены FN3, которые связываются с доменом 3 альбумина, заключены в рамки с использованием сплошных линий. Все конструкции получают в виде биспецифических генетических слияний с одним нулевым доменом FN3 (TC25) и одним альбуминсвязывающим доменом FN3. *ABD относится к альбуминсвязывающему домену (ссылка J.T. Andersen, R. Pehrson, V. Tolmachev, M.B. Daba, L. Abrahmsen, C. Ekblad, J. Biol. Chem. 286:5234-5241 2011).

На фиг. 2 представлен фармакокинетический профиль альбуминсвязывающих доменов FN3 у яванских макаков после однократной внутривенной дозы 1 мг/кг (H9) или 2 мг/кг (ALB 18 или ALB33).

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Определения

Различные термины, относящиеся к аспектам описания, используются на протяжении описания и формулы изобретения. Такие термины должны иметь свое обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Другие специально определенные термины должны толковаться таким образом, чтобы соответствовать приведенным здесь определениям.

Используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественные объекты ссылки, если содержание явно не предписывает иное. Таким образом, например, ссылка на "клетку" включает комбинацию из двух или более клеток и т.п.

Используемый здесь термин "приблизительно", когда он относится к измеряемому значению, такому как количество, продолжительность по времени и т.п., предназначен для охвата отклонений от заданного значения до $\pm 10\%$, поскольку такие отклонения являются соответствующими для выполнения раскрытых способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, такие свойства, как молекулярная масса, условия реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, изложенные в следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближениями, которые могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые пытаются получить с помощью настоящего изобретения. Хотя бы, а не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов в отношении объема формулы изобретения, каждый числовой параметр должен, по крайней мере, истолковываться с учетом числа сообщаемых значимых цифр и путем применения обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем настоящего изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, сообщаются с максимально возможной точностью. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, обнаруживаемого в их соответствующих тестовых измерениях.

"Выделенный" означает, что биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, пептид или белок) был в значительной степени отделен, произведен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором этот компонент встречается в природе, т.е. других хромосомных и экстрахромосомных ДНК и РНК, а также белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные с помощью стандартных способов очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью

композиции и все же быть выделенными, если такая композиция не является частью естественной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

"Выделенный" домен FN3, как здесь используется, предназначен для обозначения домена FN3, который по существу не содержит других доменов FN3, имеющих различные антигенные специфичности (например, выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином, по существу не содержит домены FN3, которые специфически связывают антигены, отличные от человеческого сывороточного альбумина). Однако выделенный домен FN3, который специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого сывороточного альбумина, может обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например, от других видов (например, гомологами видов сывороточного альбумина).

Используемый здесь термин "домен фибронектина типа III (FN3)" (домен FN3) относится к домену, часто встречающемуся в белках, включающих фибронектины, тенасцин, внутриклеточные белки цитоскелета, рецепторы цитокинов 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). Приводимыми в качестве примера доменами FN3 являются 15 различных доменов FN3, присутствующих в тенасцине С человека, 15 различных доменов FN3, присутствующих в фибронектине (FN) человека, и неприродные синтетические домены FN3, описанные, например, в патенте США с № 8278419. Отдельные домены FN3 обозначаются по номеру домена и названию белка, например, третий домен FN3 тенасцина (TN3) или десятый домен FN3 фибронектина (FN10).

Используемый здесь термин "специфически связывается" или "специфическое связывание" относится к способности домена FN3 настоящего изобретения к связыванию с заранее определенным антигеном с константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 1×10^{-6} М или менее, например, приблизительно 1×10^{-7} М или менее, приблизительно 1×10^{-8} М или менее, приблизительно 1×10^{-9} М или менее, приблизительно 1×10^{-10} М или менее, приблизительно 1×10^{-11} М или менее, приблизительно 1×10^{-12} М или менее или приблизительно 1×10^{-13} М или менее. Как правило, описанный домен FN3 связывается с заранее определенным антигеном (т.е. человеческим сывороточным альбумином) с K_D , которая по крайней мере в десять раз меньше, чем его K_D для неспецифического антигена (например, казеина), что определяется с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, инструмента Proteon (BioRad). Однако описанные домены FN3, которые специфически связываются с человеческим сывороточным альбумином, могут обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например, с тем же заранее определенным антигеном из других видов (гомологами), таких как *Macaca fascicularis* (яванский макак) или *Pan troglodytes* (шимпанзе).

"Период полужизни в сыворотке", как здесь используется, обычно можно определить как время, необходимое для снижения концентрации аминокислотной последовательности, соединения или полипептида в сыворотке на 50% *in vivo*, например, из-за деградации последовательности или соединения и/или выведения или секвестрации последовательности или соединения с помощью естественных механизмов. Период полужизни *in vivo* аминокислотной последовательности, соединения или полипептида настоящего изобретения может быть определен любым известным способом, например, с помощью фармакокинетического анализа. Подходящие методики будут понятны специалисту в данной области техники и могут, например, обычно включать стадии подходящего введения теплокровному животному (т.е. человеку или другому подходящему млекопитающему, такому как мышь, кролик, крыса, свинья, собака или примат, например обезьянам из рода *Macaca* (таким как, в частности, яванские макаки (*Macaca flavicularis*) и/или макаки-резус (*Macaca mulatta*)) и бабуин (*Papio ursinus*)), подходящей дозы аминокислотной последовательности, соединения или полипептида настоящего изобретения; сбора образцов крови или других образцов от указанного животного; определения уровня или концентрации аминокислотной последовательности, соединения или полипептида настоящего изобретения в указанном образце крови и вычисления из (графика) полученных таким образом данных, времени до тех пор, пока уровень или концентрация аминокислотной последовательности, соединения или полипептида настоящего изобретения не будет снижен на 50% по сравнению с начальным уровнем после введения дозы. Ссылка приводится, например, на экспериментальную часть ниже, а также на стандартные справочники, такие как Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Ссылка также приводится на "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Peron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982).

Как также будет понятно специалисту в данной области техники (смотрите, например, стр. 6 и 7 WO 04/003019 и в других ссылках, приведенных в ней), период полужизни может быть представлен, используя такие параметры, как $t_{1/2}$ -альфа, $t_{1/2}$ -бета и площадь под кривой (AUC). В настоящем описании "период полужизни" относится к уменьшению любого из этих параметров, например любых двух из этих параметров, или, по существу, всех трех из этих параметров.

Термин "фармакокинетика" или "фармакокинетика" используется в соответствии с его принятым в

области техники значением и относится к изучению действия лекарственных средств в организме, например эффекта и продолжительности действия лекарственных средств, скорости их всасывания, распределения, метаболизма и элиминации из организма и т.д.

Используемый здесь термин "замещающий" или "замещенный" или "мутирующий" или "мутированный" относится к изменению, удалению вставки одной или более аминокислот или нуклеотидов в полипептидной или полинуклеотидной последовательности для получения варианта этой последовательности.

Используемый здесь термин "рандомизирующий" или "рандомизированный" или "с введением разнообразия" или "вводящий разнообразие" относится к выполнению по крайней мере одной замены, вставки или делеции в полинуклеотидной или полипептидной последовательности.

"Вариант", как здесь используется, относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или несколькими модификациями, например заменами, вставками или делециями.

Термин "библиотека" относится к совокупности вариантов. Библиотека может состоять из вариантов полипептида или полинуклеотида.

Используемый здесь термин "Tencon" относится к синтетическому домену фибронектина типа III (FN3), имеющему последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 и описанную в публикации заявки на патент США с № US 2010/0216708.

"Полинуклеотид", синонимично именуемый "молекулой нуклеиновой кислоты", "нуклеотидами" или "нуклеиновыми кислотами", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может быть немодифицированной РНК или ДНК или модифицированной РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничения, одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, обычно, двухцепочечными или смесью одноцепочечных и двухцепочечных областей. К тому же "полинуклеотид" относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает ДНК или РНК, содержащие одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. Различные модификации могут быть осуществлены в ДНК и РНК; таким образом, "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. "Полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космид или вирус, в который может быть функционально встроено другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию этого сегмента.

Используемый здесь термин "клетка-хозяин" может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут возникнуть в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина. Термины "экспрессия" и "продукция" используются здесь как синонимы и относятся к биосинтезу продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того, охватывают все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессия или продуцирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить в цитоплазме клетки или в экстраклеточной среде, такой как среда для выращивания клеточной культуры. Значение "по существу тот же" может различаться в зависимости от контекста, в котором используется этот термин. Из-за того, что природная вариация последовательности, вероятно, существует среди тяжелых и легких цепей и кодирующих их генов, можно ожидать нахождения некоторого уровня вариации в аминокислотных последовательностях или генах, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные здесь, с небольшим влиянием на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и сродство) или без него. Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционным успехом консервативных вариаций аминокислотной последовательности, которые существенно не изменяют природу кодируемого белка.

Обзор раскрытых доменов FN3

Tencon (SEQ ID NO: 1) представляет собой не встречающийся в природе домен фибронектина типа III (FN3), сконструированный из консенсусной последовательности из пятнадцати доменов FN3 тена-

на-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; публикация заявки на патент США с № 2010/0216708). Кристаллическая структура Tenscon выявляет шесть петель, выставленных на поверхность, которые соединяют семь бета-цепей, что характерно для доменов FN3, бета-цепей, обозначаемых A, B, C, D, E, F и G, и петли, обозначаемые как AB-, BC-, CD-, DE-, EF- и FG-петли (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; патент США с № 6673901). Эти петли, или выбранные остатки в каждой петле, могут быть подвергнуты рандомизации для конструирования библиотек доменов фибронектина типа III (FN3), которые могут использоваться для отбора новых молекул, которые связываются с сывороточным альбумином. В табл. 1 приведены положения и последовательности каждой петли и бета-цепи в Tenscon (SEQ ID NO: 1).

Библиотека, сконструированная на основе последовательности Tenscon, такая как описанные ниже библиотеки TCL1 или TCL2, может, таким образом, содержать рандомизированную FG-петлю или рандомизированные BC- и FG-петли. BC-петля Tenscon имеет длину 7 аминокислот, таким образом, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот могут быть подвергнуты рандомизации в библиотеке с введенным разнообразием в BC-петле и сконструированной на основе последовательности Tenscon. FG-петля Tenscon имеет длину 7 аминокислот, таким образом, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот могут быть подвергнуты рандомизации в библиотеке с введенным разнообразием в FG-петле и, сконструированной на основе последовательности Tenscon. Дополнительное разнообразие в петлях в библиотеках Tenscon может быть достигнуто путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, FG- и/или BC-петли могут быть удлинены на 1-22 аминокислоты или уменьшены на 1-3 аминокислоты. FG-петля в Tenscon имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител находится в диапазоне 4-28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия, разнообразие может быть введено в последовательность FG-петли, а также в длину, чтобы соответствовать диапазону 4-28 остатков для длин CDR3 антител. Например, FG-петля может быть дополнительно разнообразна по длине путем удлинения петли на еще 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

Библиотека, сконструированная на основе последовательности Tenscon, может также иметь рандомизированные альтернативные поверхности, которые образуются на стороне домена FN3 и включают две или более бета-цепей и по крайней мере одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-цепях C и F, а также в CD- и FG-петлях (поверхность C-CD-F-FG). Конструкция библиотеки на основе альтернативной поверхности C-CD-F-FG Tenscon описана в публикации заявки на патент США с № US 2013/0226834. Библиотека, сконструированная на основе последовательности Tenscon, также включает библиотеки, сконструированные на основе вариантов Tenscon, таких как варианты Tenscon, которые содержат замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 (нумерация остатков, соответствующая SEQ ID NO:1) и которые демонстрируют увеличенную термостабильность. Приводимые в качестве примера варианты Tenscon описаны в публикации заявки на патент США с № 2011/0274623, и включают Tenscon27 (SEQ ID NO:4), содержащий замены E11R, L17A, N46V и E86I по сравнению с Tenscon SEQ ID NO:1.

Таблица 1

Домен FN3	Tenscon (SEQ ID NO:1)
A-цепь	1-12
AB-петля	13-16
B-цепь	17-21
BC-петля	22-28
C-цепь	29-37
CD-петля	38-43
D-цепь	44-50
DE-петля	51-54
E-цепь	55-59
EF-петля	60-64
F-цепь	65-74
FC-петля	75-81
G-цепь	82-89

Библиотеки на основе Tenscon или других последовательностей FN3 могут быть подвергнуты рандомизации в выбранных положениях остатков с использованием случайной или определенной совокупности аминокислот. Например, варианты в библиотеке, содержащие случайные замены, могут быть созданы с использованием кодонов NNK, которые кодируют все 20 встречающихся в природе аминокислот. В других схемах введения разнообразия могут использоваться кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно, могут использоваться кодоны NNS для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в положениях, подлежащих введению разнообразия, можно синтезировать, например, с использованием технологии

Slonomics® (http://www_sloning_com). В случае этой технологии используется библиотека готовых двухцепочечных триплетов, которые действуют как универсальные строительные блоки, достаточные для тысяч процессов синтеза генов. Библиотека триплетов представляет все возможные комбинации последовательностей, необходимые для построения любой желаемой молекулы ДНК. Обозначения кодонов соответствуют хорошо известному коду IUB.

Домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, описанные здесь, могут быть выделены путем получения библиотеки FN3, такой как библиотека Tencon, с использованием цис-дисплея для лигирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментом ДНК, кодирующим RepA, для создания пула комплексов белок-ДНК, образуемых после трансляции *in vitro*, в которых каждый белок стабильно связан с кодирующей его ДНК (патент США с № 7842476; Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 2806-2810, 2004), и анализа библиотеки на специфическое связывание с человеческим сывороточным альбумином любым способом, известным в данной области техники и описанным в разделе "Примеры". Приводимыми в качестве примера, хорошо известными способами, которые могут использоваться, являются ELISA, сэндвич-иммуноанализ и конкурентные и неконкурентные анализы (смотрите, например, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Идентифицированные домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, дополнительно характеризуют в соответствии с желаемыми характеристиками.

Описанные здесь домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, могут быть получены с использованием любого домена FN3 в качестве матрицы для создания библиотеки и скрининга библиотеки на предмет молекул, специфически связывающихся с человеческим сывороточным альбумином, используя предусмотренные способы. Приводимыми в качестве примера доменами FN3, которые могут использоваться, являются третий домен FN3 теназина С (TN3) (SEQ ID NO:68), фибкон (SEQ ID NO: 69146) и десятый домен FN3 фибронектина (FN10) (SEQ ID NO:70). Стандартные методы клонирования и экспрессии используются для клонирования библиотек в вектор или для синтеза кассет в виде двухцепочечных кДНК библиотеки, для экспрессии или трансляции библиотек *in vitro*. 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 с № 5643768) могут использоваться. Библиотеки вариантов домена FN3 могут быть экспрессированы в виде слитых белков, представляемых на поверхности, например, любого подходящего бактериофага. Способы представления слитых полипептидов на поверхности бактериофага хорошо известны (публикация заявки на патент США № 2011/0118144; публикация международной заявки на патент США № WO 2009/085462; патент США № 6969108; патент США № 6172197; патент США № 5223409; патент США № 6582915; патент США № 6472147).

В некоторых вариантах осуществления, описанных здесь, домен FN3, специфически связывающийся с человеческим сывороточным альбумином, основан на последовательности Tencon SEQ ID NO:1 или последовательности Tencon27 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4, необязательно содержащей замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 и/или 86.

Домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, настоящего изобретения могут быть модифицированы для улучшения их свойств, например, увеличения термостабильности и обратимости свертывания и разворачивания под действием тепла. Несколько методов были применены для увеличения кажущейся термостабильности белков и ферментов, включая конструктивный расчет, основанный на сравнении с очень похожими термостабильными последовательностями, конструирование стабилизирующих дисульфидных мостиков, мутации для увеличения склонности к образованию альфа-спиралей, конструирование солевых мостиков, изменение поверхностного заряда белка, направленную эволюцию и составление консенсусных последовательностей (Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol, 12, 371-375, 2001). Высокая термостабильность может увеличивать выход экспрессированного белка, улучшать растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать потребность в холодовой цепи при производстве. Остатки, которые могут быть замещены для увеличения термостабильности Tencon (SEQ ID NO:1), представляют собой положения остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 и описаны в публикации заявки на патент США № 2011/0274623. Замены, соответствующие этим остаткам, могут быть включены в содержащие домен FN3 молекулы настоящего изобретения.

Определение стабильности белка и неустойчивости белка можно рассматривать как одинаковые или различные аспекты целостности белка. Белки являются чувствительными или "неустойчивыми" к денатурации, вызванной теплом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменениями осмолярности и pH окружающей среды, если в жидком растворе, при фильтрации через узкие поры, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-излучением, химической или тепловой сушкой или любым другим действием или силой, создается механическое сдвиговое усилие, которое может вызвать нарушение структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с помощью стандартных методов. Например, стабильность молекулы может быть определена путем измерения температуры плавления (" T_m "), температуры в °C, при которой половина молекул разворачивается, используя стандартные методы. Как правило, чем выше T_m , тем стабильнее молекулы. Помимо тепла хи-

мическая среда также изменяет способность белка поддерживать определенную трехмерную структуру.

В одном варианте осуществления домен FN3, специфически связывающийся с человеческим сывороточным альбумином, настоящего изобретения может проявлять стабильность, повышенную по крайней 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 разработки, что определяется по увеличению T_m .

Химическая денатурация также может быть определена различными методами. Химические денатурирующие вещества включают гидрохлорид гуанидиния, тиоцианат гуанидиния, мочевины, ацетон, органические растворители (ДМФА, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотрейтол, бета-меркаптоэтанол, динитротиибензол и гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные детергенты, кислоты (например, соляную кислоту (HCl), уксусную кислоту (CH_3COOH), галогенированные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и целевые денатурирующие вещества. Количественная оценка степени денатурации может основываться на потере функциональных свойств, таких как способность к связыванию молекулы-мишени, или по физико-химическим свойствам, таким как склонность к агрегации, воздействию недоступных ранее остатков растворителей или разрыву или образованию дисульфидных связей.

Домен FN3 настоящего изобретения может быть сконструирован в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, в качестве средства для увеличения валентности и, соответственно, avidности связывания молекулы-мишени или для создания би- или полиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более различных молекул-мишеней. Димеры и мультимеры могут быть созданы путем связывания моноспецифических, би- или полиспецифических белковых каркасов, например, путем включения аминокислотного линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Приводимые в качестве примера линкеры включают $(\text{GS})_2$ (SEQ ID NO:54), $(\text{GGGS})_2$ (SEQ ID NO:55), $(\text{GGGS})_5$ (SEQ ID NO:56), $(\text{AP})_2$ (SEQ ID NO:57), $(\text{AP})_5$ (SEQ ID NO:58), $(\text{AP})_{10}$ (SEQ ID NO:59), $(\text{AP})_{20}$ (SEQ ID NO:60) и $\text{A(EAAAK)}_5\text{AAA}$ (SEQ ID NO:61). Димеры и мультимеры могут быть связаны друг с другом в направлении от N-конца к C-концу. Использование встречающихся в природе, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитые полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989; Alftan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; патент США № 5856456).

Связующие для человеческого сывороточного альбумина

Домены FN3 быстро выводятся из кровотока посредством фильтрации в почках и деградации благодаря их небольшому размеру, составляющему ~10 кДа. В определенных аспектах в настоящем изобретении предоставляются домены FN3, которые специфически связываются с сывороточным альбумином, например человеческим сывороточным альбумином (HSA), для продления периода полужизни домена FN3.

Описанные альбумин-специфические домены FN3 связываются с доменом I или III человеческого сывороточного альбумина и имеют период полужизни в сыворотке, превышающий по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tенсон SEQ ID NO: 67, тем самым обеспечивая эффективный способ продления *in vivo* периода полужизни в сыворотке лекарственных средств или белков, конъюгированных с ними.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3 специфически связывается с доменом I человеческого сывороточного альбумина SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3 специфически связывается с доменом III человеческого сывороточного альбумина SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления альбуминспецифические антитела имеют период полужизни в сыворотке, превышающий по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tенсон SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления описанные домены FN3 перекрестно реагируют с альбумином сыворотки *Macaca fascicularis* (яванского макака) SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления домены FN3, связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, включают инициатор метионин (Met), связанный с N-концом молекулы.

В некоторых вариантах осуществления домены FN3, связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, включают цистеин (Cys), связанный с C-концом домена FN3.

Добавление N-концевого Met и/или C-концевого Cys может облегчать экспрессию и/или конъюгирование молекул, продлевающих период полужизни.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, 52 или 53.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3 включает аминокислотную последовательность, которая на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3 включает аминокислотную последовательность, которая содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином, включает остаток цистеина по крайней мере в одном положении остатка, соответствующем положениям остатков 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 61 SEQ ID NO: 1, или на С-конце.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3, описанный здесь, может включать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51-53, в которой С-цепь, CD-петля, F-цепь и FG-петли заменены соответствующей совокупностью, состоящей из указанных С-цепи, CD-петли, F-цепи и FG-петель из любой из описанных последовательностей альбумин-специфических доменов FN3 (т.е. SEQ ID NO: 51-53) или последовательностей, идентичных на по крайней мере 85, 90, 95, 97, 98 или 99% последовательностям С-цепи, CD-петле, F-цепи и FG-петле четырех основных последовательностей домена FN3.

В некоторых вариантах осуществления выделенные альбумин-специфические домены FN3 включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51. Этот альбуминспецифический домен FN3 может связываться с доменом I или III человеческого сывороточного альбумина. Этот альбумин-специфический домен FN3 может иметь период полужизни в сыворотке, превышающий по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tencon SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления выделенные альбумин-специфические домены FN3 включают последовательность, представленную SEQ ID NO: 52. Этот альбуминспецифический домен FN3 может связываться с доменом I или III человеческого сывороточного альбумина. Этот альбумин-специфический домен FN3 может иметь период полужизни в сыворотке, превышающий по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tencon SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления выделенные альбумин-специфические домены FN3 включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53. Этот альбуминспецифический домен FN3 может связываться с доменом I или III человеческого сывороточного альбумина. Этот альбумин-специфический домен FN3 может иметь период полужизни в сыворотке, превышающий по крайней мере в 10 раз период полужизни в сыворотке последовательности Tencon SEQ ID NO: 67.

Слияния специфических в отношении человеческого сывороточных альбумина доменов FN3

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены конъюгаты, включающие домен FN3, связывающийся с сывороточным альбумином, и по крайней мере одну дополнительную составляющую. Дополнительная составляющая может быть полезна для любой диагностической цели, визуализации или терапевтической цели.

В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке составляющей, слитой с описанным доменом FN3, увеличена относительно периода полужизни в сыворотке этой составляющей, если она не конъюгирована с доменом FN3. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке слияния с доменом FN3 длиннее на по крайней мере 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500 или 3000% периода полужизни в сыворотке составляющей, если она не слита с описанным доменом FN3. В других вариантах осуществления период полужизни в сыворотке слияния с доменом FN3 длиннее в по крайней мере 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40 или 50 раз периода полужизни в сыворотке этой составляющей, если она не слита с описанным доменом FN3. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке слияния с доменом FN3 составляет по крайней мере 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 ч у яванских макаков.

Соответственно, описанные здесь молекулы слияния с доменом FN3 полезны для увеличения периода полужизни терапевтической составляющей путем создания слияния между терапевтической составляющей и описанным доменом FN3. Такие слитые молекулы могут использоваться для лечения состояний, которые реагируют на биологическую активность терапевтической составляющей, содержащейся в слиянии. В настоящем изобретении предусматривается использование описанных молекул слияния с доменом FN3 при заболеваниях, вызванных нарушением регуляции любого из следующих белков или молекул.

Гетерологичная составляющая

В некоторых вариантах осуществления описанные домены FN3 сливаются со второй составляющей, которая представляет собой небольшую органическую молекулу, нуклеиновую кислоту или белок. В некоторых вариантах осуществления описанные домены FN3 сливаются с терапевтической составляющей, мишенью которой являются рецепторы, лиганды рецепторов, белки вирусной оболочки, белки иммунной системы, гормоны, ферменты, антигены или белки, передающие сигналы в клетке. Слияние может быть образовано путем присоединения второй составляющей к любому концу описанных доменов FN3, т.е. расположений домен FN3-терапевтическая молекула или терапевтическая молекула-домен FN3.

В других приводимых в качестве примера вариантах осуществления описанный домен FN3 сливается с одним или более дополнительных доменов FN3. Например, описанный домен FN3 может быть слит с одним, двумя, тремя, четырьмя или более дополнительных доменов FN3. Дополнительные домены FN3 могут связываться с одинаковыми или разными мишенями, отличными от сывороточного альбумина.

В некоторых вариантах осуществления в заявке предоставляется слияние FN3-Y, которое может быть представлено формулой FN3-Xi-Y или Y-Xi-FN3, где FN3 представляет собой описанный здесь домен FN3 (включающий любые N-концевые и/или С-концевые удлинения), Xi представляет собой полипептидный линкер (подходящие линкеры включают, например, любую из SEQ ID NO: 54-61) и Y представляет собой терапевтическую составляющую, описанную здесь.

В некоторых вариантах осуществления в заявке предоставляется слияние FN3-Y, которое может быть представлено формулой FN3-Xi-Cys-X₂-Y или Y-Xi-Cys-X₂-FN3, где FN3 представляет собой выделенный домен FN3, описанный здесь (включающий любые N-концевые и/или С-концевые удлинения), Xi представляет собой необязательный полипептидный линкер (подходящие линкеры включают, например, любую из SEQ ID NO:54-61), Cys представляет собой остаток цистеина, X₂ представляет собой химически полученный спейсер и Y представляет собой терапевтическую составляющую, описанную здесь. В приводимых в качестве примера вариантах осуществления химически полученный спейсер содержит малеимидный фрагмент, который может использоваться для конъюгирования терапевтической составляющей с С-концевым Cys описанных доменов FN3 или для конъюгирования описанных доменов FN3 с С-концевым Cys терапевтической составляющей, с помощью реакции Майкла, как описано здесь далее. В других аспектах описанный домен FN3 может быть связан с двумя или более терапевтическими составляющими. Например, две составляющие могут быть связаны с описанными доменами FN3 в различных схемах расположения, таких как, например, от N-конца к С-концу последовательности слияния, следующим образом: X-Y-FN3, X-FN3-Y или FN3-X-Y, где X и Y представляют две различные терапевтические составляющие. Две различные терапевтические составляющие могут быть выбраны из любой из раскрытых здесь составляющих.

Деиммунизация связывающих полипептидов

Аминокислотные последовательности связующих для сывороточного альбумина и их слияний могут быть изменены для удаления одного или более В- или Т-клеточных эпитопов. Белок, включая описанные слияния с доменом FN3, описанные здесь, может быть подвергнут деиммунизации, чтобы сделать его неиммуногенным или менее иммуногенным для конкретного вида. Деиммунизация может быть достигнута путем структурных изменений белка. Может быть использован любой метод деиммунизации, известный специалистам в данной области, см., например, WO 00/34317, раскрытие которой полностью включено сюда.

В одном варианте осуществления последовательности связующих для сывороточного альбумина и их слияний можно проанализировать на наличие мотивов связывания МНС класса II. Например, сравнение может быть выполнено с базами данных МНС-связывающих мотивов, например, путем перебора базы данных "motifs" во всемирной сети по адресу wehil.wehi.edu.au. В качестве альтернативы, пептиды, связывающие МНС класса II, могут быть идентифицированы с использованием методов с использованием потока вычислений, таких как методы, разработанные Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249, 244-250 (1995)), посредством чего последовательные перекрывающиеся пептиды из полипептида проверяют на предмет силы их связывания с белками МНС класса II. Вычислительные алгоритмы прогнозирования связывания включают iTope™, Tepitope, SYFPEITHI, EpiMatrix (EpiVax) и MHCpred. Чтобы способствовать идентификации пептидов, связывающих МНС класса II, можно искать ассоциированные признаки последовательности, которые относятся к успешно представленным пептидам, такие как амфипатичность и мотивы Ротбарда, а также сайты расщепления катепсином В и другими ферментами процессирования.

Выявив потенциальные (например, человеческие) Т-клеточные эпитопы, эти эпитопы затем удаляют путем изменения одной или более аминокислот, как требуется для удаления Т-клеточного эпитопа. Обычно это будет включать изменение одной или более аминокислот внутри самого Т-клеточного эпитопа. Это может включать изменение аминокислоты рядом с эпитопом относительно первичной структуры белка или аминокислоты, которая не является смежной в первичной структуре, но является смежной во вторичной структуре молекулы. Предполагаемое обычное изменение будет заменой аминокислоты, но возможно, что в некоторых случаях добавления или удаления аминокислот будут подходящими. Все изменения могут быть осуществлены с помощью технологии рекомбинантных ДНК, так что конечная молекула может быть получена путем экспрессии в рекомбинантном хозяине, например, с помощью хорошо известных методов, но также может использоваться химия белка или любые другие способы изменения молекулы.

После удаления идентифицированных Т-клеточных эпитопов деиммунизированную последовательность можно снова проанализировать, чтобы убедиться в том, что не были созданы новые Т-клеточные эпитопы, и, если они есть, эпитоп(ы) можно удалить.

Не все Т-клеточные эпитопы, идентифицированные путем вычислений, должны быть удалены. Специалист в данной области техники поймет значение "силы" или, точнее, потенциальной иммуногенности конкретных эпитопов. В различных вычислительных методах создаются оценки для потенциальных эпитопов. Специалист в данной области техники поймет, что могут быть удалены только эпитопы с высокой оценкой. Специалист также поймет, что существует баланс между удалением потенциальных эпитопов и поддержанием средства связывания или другой биологической активности белка. Поэтому одна стратегия состоит в том, чтобы последовательно вводить замены в описанные домены FN3 или сли-

тый с доменом FN3 белок, а затем проверять на связывание с мишенью или другую биологическую активность и иммуногенность.

Дополнительные модификации

В некоторых вариантах осуществления связующие для сывороточного альбумина и их слияния могут, кроме того, включать посттрансляционные модификации. Приводимые в качестве примера посттрансляционные модификации белков включают фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, ADP-рибозилирование, убиквитинирование, гликозилирование, карбонилирование, сумоилирование, биотинилирование или добавление полипептидной боковой цепи или гидрофобной группы. В результате модифицированные связующие для сывороточного альбумина и их слияния могут содержать неаминокислотные элементы, такие как липиды, поли- или моносахарид и фосфаты. Предпочтительной формой гликозилирования является сиалилирование, которое конъюгирует одну или более составляющих в виде сиаловой кислоты с полипептидом. Составляющие в виде сиаловой кислоты увеличивают растворимость и время полужизни в сыворотке, а также уменьшают возможную иммуногенность белка. См., например, Raju et al. *Biochemistry*. 2001 Jul 31; 40(30): 8868-76. Эффекты таких неаминокислотных элементов на функциональность связующих для сывороточного альбумина или их слияний могут быть проверены по их способности к связыванию конкретного сывороточного альбумина (например, HSA или RhSA) и/или функциональной роли, придаваемой специфической составляющей, не являющейся доменом FN3, в случае слияния (например, эффект FGF21 на поглощение глюкозы).

Варианты векторов и полинуклеотидов

Также в настоящее описание включены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие любой из описанных здесь белков.

Как понятно специалистам в данной области техники, из-за вырожденности третьего основания почти каждая аминокислота может быть представлена более чем одним кодоном-триплетом в кодирующей нуклеотидной последовательности. Кроме того, незначительные изменения пар оснований могут привести к консервативной замене в кодируемой аминокислотной последовательности, но не ожидается, что они существенно изменят биологическую активность продукта гена. Следовательно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая описанный здесь белок, может быть слегка модифицирована в последовательности и все же кодировать ее соответствующий продукт гена. Некоторые приводимые в качестве примера нуклеиновые кислоты, кодирующие связующие для сывороточного альбумина и их слияния, описанные здесь, включают нуклеиновые кислоты, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 69-72.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из различных белков или полипептидов, раскрытых здесь, могут быть синтезированы химически. Частота использования кодонов может быть выбрана, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такая частота использования кодонов будет зависеть от выбранного типа клеток. Специализированные системы частот использования кодонов были разработаны для *E.coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, клеток растений, дрожжевых клеток и клеток насекомых. См., например: Mayfield et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 100 (2):438-42; Sinclair et al. *Protein Expr Purif*. 2002 (1): 96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol*. 2001(5):446-9; Makrides et al. *Microbiol Rev*. 1996 60 (3): 512-38 и Sharp et al. *Yeast*. 1991 7(7):657-78.

Общие методы манипулирования нуклеиновой кислотой находятся в компетенции специалиста в данной области и также описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, или F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987) и периодических обновлениях, включенных сюда посредством ссылки. ДНК, кодирующая белок, функционально связана с подходящими регулируемыми транскрипцию или трансляцию элементами, происходящими из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают транскрипционный промотор, необязательную операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосом на мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Способность к репликации в хозяине, обычно придаваемая началом репликации, и селективный ген для облегчения распознавания трансформантов включают дополнительно. Подходящие регуляторные элементы хорошо известны в данной области техники.

Описанные здесь белки и слитые белки могут быть получены в виде белка, слитого с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно является сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и процессируется (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют нативную сигнальную последовательность, сигнальная последовательность заменяется прокариотической сигнальной последовательностью, выбираемой, например из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *lpp* или термостабильного энтеротоксина II. Для секреции дрожжами нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью дрожжевой инвертазы, лидерной последовательностью α -фактора (в том числе лидерными после-

довательностями альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *S. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в публикации РСТ № WO 90/13646. При экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD простого герпеса. ДНК для таких областей предшественников может быть лигирована в рамке считывания с ДНК, кодирующей белок.

Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, дрожжевых клетках, клетках грибов, насекомых, растений, животных, человеке или ядродержащих клетках других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминирования транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5', а иногда и из 3', нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей поливалентное антитело. Одним из полезных компонентов терминирования транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. публикацию РСТ № WO 94/11026 и экспрессионный вектор, раскрытый в ней.

Рекомбинантная ДНК может также включать любой тип последовательности метки для белков, который может быть полезен для очистки белка. Примеры меток для белков включают, но без ограничения ими, гистидиновую метку, метку FLAG, метку мус, метку HA или метку GST. Векторы для клонирования и экспрессии, подходящие для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, можно найти в *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Elsevier, New York, 1985), соответствующее раскрытие которого включено таким образом посредством ссылки. Экспрессионная конструкция вводится в клетку-хозяина с использованием способа, подходящего для клетки-хозяина, что будет очевидно специалисту в данной области техники. В данной области техники известен ряд способов введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, включая, но без ограничения ими, электропорацию; трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфицирование (в случае которой вектором является инфекционный агент).

Подходящие клетки-хозяева включают прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или *Bacillus* spp. Дрожжи, предпочтительно из видов *Saccharomyces*, таких как *S. cerevisiae*, также могут использоваться для продукции полипептидов. Различные системы культивирования клеток млекопитающих или насекомых также могут использоваться для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для продукции гетерологичных белков в клетках насекомых рассмотрены Luckow и Summers (*Bio/Technology*, 6:47, 1988). В некоторых случаях будет желательно продуцировать белки в клетках позвоночных, например, для гликозилирования, и размножение клеток позвоночных в культуре (культура ткани) стало обычной процедурой. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают эндотелиальные клетки, клетки почки обезьяны COS-7, клетки CV-1, L-клетки, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки эмбриона человека, клетки HeLa, 293, 293T и клетки ВНК. Для многих применений небольшой размер белковых мультимеров, описанных здесь, сделает *E. coli* предпочтительным способом экспрессии.

Продуцирование белка

Клетки-хозяева трансформируются описанными здесь векторами для экспрессии или клонирования с целью продуцирования белков и культивируются в обычных питательных средах, модифицированных в зависимости от необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования белков настоящего изобретения, могут культивироваться в ряде сред. Коммерчески доступные среды, такие как среда F10 Ham (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), патентах США с №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или патенте США № Re. 30985, может использоваться в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может при необходимости быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (например, лекарственным средством GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), а также глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту со средним уровнем компетентности.

Раскрытые здесь белки также могут быть получены с использованием бесклеточных трансляционных систем. Для таких целей нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, должны быть модифицированы для допуска транскрипции *in vitro* с продукцией мРНК и допуска бесклеточной трансляции мРНК в конкретной используемой бесклеточной системе. Приводимые в качестве примера эукариотические бесклеточные трансляционные системы включают, например, имеющие отношения к млекопитающим или дрожжевые бесклеточные трансляционные системы, а приводимые в качестве примера прокариотические бесклеточные трансляционные системы включают, например, бактериальные бесклеточные трансляционные системы.

Раскрытые здесь белки также могут быть получены путем химического синтеза (например, с помощью способов, описанных в *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Модификации белка также могут быть получены путем химического синтеза.

Раскрытые здесь белки могут быть очищены способами выделения/очистки белков, общеизвестных в области химии белка. Неограничивающие примеры включают экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, хроматографию с обращенной фазой, гель-фильтрацию, гелепроницающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки белки могут быть подвергнуты замене буфера на различные буферы и/или сконцентрированы любым из множества способов, известных в данной области, включая, но без ограничения ими, фильтрацию и диализ.

Очищенные белки предпочтительно имеют степень чистоты, составляющую по крайней мере 85%, более предпочтительно по крайней мере 95% и наиболее предпочтительно по крайней мере на 98%. Независимо от точного численного значения степени чистоты, белки являются достаточно чистыми для применений в качестве фармацевтического продукта.

Визуализация, диагностика и другие применения

Предоставленные здесь слияния с доменами FN3 могут использоваться для лечения ряда заболеваний и нарушений, основываясь на наименовании гетерогенной молекулы, слитой с описанными доменами FN3. Применения слияний с доменами FN3 могут быть определены квалифицированным специалистом на основе знаний в данной области техники и предоставленной здесь информации. Применение различных слитых с доменами FN3 белков подробно описано здесь. Слияния с доменами FN3 могут вводиться любому являющемуся млекопитающим субъекту или пациенту, в том числе как в организм человека, так и в организм не человека.

Связующие для сывороточного альбумина и слитые молекулы, описанные здесь, могут быть помечены детектируемым образом и использованы для контактирования с клетками, экспрессирующими, например, белок, связываемый слитой молекулой, для визуализации или диагностики. Может использоваться любой известный в данной области техники способ конъюгирования белка с детектируемой составляющей, в том числе те способы, которые описаны Hunter et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13: 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981) и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982).

В некоторых вариантах осуществления связующие для сывороточного альбумина и слитые молекулы, описанные здесь, дополнительно присоединяются к метке, которая может быть детектирована (например, метка может представлять собой радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента). Метка может представлять собой радиоактивный агент, такой как: радиоактивные тяжелые металлы, такие как хелаты железа, радиоактивные хелаты гадолиния или марганца, позитронные излучатели кислорода, азота, железа, углерода или галлия, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}T , ^{132}I или ^{99}Tc . Связующее для сывороточного альбумина и слитая молекула, присоединенная к такой составляющей, может использоваться в качестве средства визуализации и вводиться в количестве, эффективном для диагностического использования у млекопитающего, такого как человек, а затем детектируют локализацию и накопление агента для визуализации. Локализацию и накопление агента для визуализации можно детектировать с помощью радиосцинтиграфии, ядерного магнитного резонанса, компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии. Как будет очевидно квалифицированному специалисту, количество вводимого радиоизотопа зависит от радиоизотопа. Специалисты со средним уровнем компетентности в данной области могут легко составить количество вводимого агента для визуализации на основе удельной активности и энергии конкретного радионуклида, используемого в качестве активной составляющей.

Связующие для сывороточного альбумина и слитые молекулы также полезны в качестве агентов для аффинной очистки. В этом процессе белки иммобилизуются на подходящей подложке, такой как смола Sephadex или фильтровальная бумага, с использованием хорошо известных в данной области техники способов. Белки могут использоваться в любом известном методе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямой и непрямой сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Терапевтические препараты и способы введения

В настоящем изобретении предоставляются способы введения терапевтической составляющей, слитой с описанным доменом FN3, причем период полужизни терапевтической составляющей продлевается при слиянии с описанными доменами FN3. Методы и дозы для введения слитых конструкций будут варьировать в зависимости от типа терапевтической составляющей, слитой с описанными доменами FN3, и конкретного состояния, подвергаемого лечению, но может быть легко определены квалифицированным специалистом. В целом, регулирующие органы требуют, чтобы белковый реагент, используемый в качестве терапевтического средства, был приготовлен так, чтобы он имел приемлемо низкие уровни пирогенов. Соответственно, терапевтические препараты будут, как правило, отличаться от других составов тем, что они по существу не содержат пирогенов или, по крайней мере, содержат не более чем приемлемые уровни пирогена, как определено соответствующим регулирующим органом (например, FDA Управлением по контролю за продуктами и медикаментами). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты описанных доменов FN3 и слитых с ними молекул включают, например, 1-20 мМ янтарную кислоту, 2-10% сорбита и 1-10% глицина при pH 4,0-7,0. В приводимом в качестве примера варианте осуществления фармацевтические препараты описанных доменов FN3 и слитых с ними молекул включают, например, 10 мМ янтарную кислоту, 8% сорбита и 5% глицина при pH 6,0.

В некоторых вариантах осуществления описанные домены FN3 и их слияния являются фармацевтически приемлемыми для млекопитающего, в частности человека. "Фармацевтически приемлемый" полипептид относится к полипептиду, который вводят животному без значительных неблагоприятных медицинских последствий. Примеры фармацевтически приемлемых доменов FN3, раскрытых здесь, и их слияний включают домены FN3, в которых отсутствует интегринсвязывающий домен (RGD), и композиции, которые по существу не содержат эндотоксинов или имеют очень низкие уровни эндотоксинов.

Терапевтические композиции могут вводиться с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем в стандартной лекарственной форме. Введение может быть парентеральным (например, внутривенным, подкожным), пероральным или местным, в качестве неограничивающих примеров. Композиция может быть в форме пилюли, таблетки, капсулы, жидкости или таблетки с замедленным высвобождением в случае перорального введения; жидкости в случае внутривенного, подкожного или парентерального введения; или геля, лосьона, мази, крема или полимера или другого носителя с замедленным высвобождением в случае местного применения.

Способы, хорошо известные в данной области техники для приготовления препаратов, можно найти, например, в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Препараты для парентерального введения могут, например, содержать наполнители, стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрированные нафталины. Биосовместимый, биоразлагаемый полилактид, сополимер лактида и гликолида или сополимеры оксиэтилена с оксипропиленом могут использоваться для контролирования высвобождения соединений. Препараты в виде наночастиц (например, биоразлагаемых наночастиц, твердых липидных наночастиц, липосом) могут использоваться для контролирования биораспределения соединений. Другие потенциально применимые системы парентеральной доставки включают частицы сополимера этилена с винилацетатом, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в препарате варьирует в зависимости от ряда факторов, включающего дозу вводимого лекарственного средства и путь введения.

Полипептид может необязательно вводиться в виде фармацевтически приемлемой соли, такой как нетоксичные соли присоединения кислоты или комплексы металлов, которые обычно используются в фармацевтической промышленности. Примеры кислотно-аддитивных солей включают органические кислоты, такие как уксусная, молочная, пимовая, малеиновая, лимонная, яблочная, аскорбиновая, янтарная, бензойная, пальмитиновая, субериновая, салициловая, винная, метансульфоновая, толуолсульфоновая или трифторуксусная кислоты и т.п.; полимерные кислоты, такие как дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза или т.п.; и неорганические кислоты, такие как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота или т.п. Комплексы металлов включают цинк, железо и т.п. В одном примере полипептид готовят в присутствии ацетата натрия для увеличения термостабильности. Препараты для перорального применения включают таблетки, содержащие активный ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми наполнителями. Этими наполнителями могут быть, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахароза и сорбит), смазывающие агенты, способствующие скольжению вещества и антиадгезивы (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксид кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк).

Препараты для перорального применения также могут быть предоставлены в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой.

Терапевтически эффективная доза относится к дозе, которая вызывает терапевтические эффекты, ради которых она вводится. Точная доза будет зависеть от нарушения, подвергаемого лечению, и может

быть установлена специалистом в данной области техники с использованием известных методов. Обычно слияние с доменом FN3 вводят в количестве от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/кг в день, предпочтительно от 0,01 до приблизительно 30 мг/кг в день, наиболее предпочтительно от 0,1 до приблизительно 20 мг/кг в день. Полипептид может вводиться ежедневно (например, один, два, три раза или четыре раза в день) или реже (например, через день, один или два раза в неделю или ежемесячно). Кроме того, как известно в данной области техники, могут потребоваться подборы по возрасту, а также по весу тела, общему состоянию здоровья, полу, рациону питания, времени введения, взаимодействию с лекарственными средствами и тяжести заболевания, и это можно будет осуществить с помощью проведения обычных экспериментов специалистами в данной области техники.

Наборы для обнаружения человеческого сывороточного альбумина

Здесь предоставляются наборы для обнаружения человеческого сывороточного альбумина в биологическом образце. Эти наборы включают один или более из специфических в отношении сывороточного альбумина доменов FN3, описанных здесь, и инструкции по применению набора.

Предоставленный специфический в отношении сывороточного альбумина домен FN3 может находиться в растворе; быть лиофилизированным; нанесенным на подложку, носитель или пластину; или детектируемым образом помечен.

Описанные наборы также могут включать дополнительные компоненты, применимые для выполнения описанных здесь способов. Например, наборы могут включать средства для получения образца от субъекта, контроль или контрольный образец, например, образец от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта, не имеющего рака, один или более отсеков для образцов, и/или инструктивный материал, который описывает выполнение способа настоящего изобретения, и специфические для ткани контроля или стандарты.

Средства для определения уровня сывороточного альбумина могут, кроме того, включать, например, буферы или другие реагенты для использования в анализе для определения уровня сывороточного альбумина. Инструкции могут быть, например, печатными инструкциями для выполнения анализа и/или инструкциями для оценки уровня сывороточного альбумина.

Описанные наборы могут также включать средства для выделения образца из субъекта. Эти средства могут включать один или более элементов оборудования или реагентов, которые могут использоваться для получения жидкости или ткани от субъекта. Средства для получения образца от субъекта также могут включать средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из образца крови. Предпочтительно набор предназначен для применения являющимся человеком субъектом.

Примеры

Следующие примеры предоставлены для дополнения предшествующего раскрытия и для обеспечения лучшего понимания описанного здесь объекта. Эти примеры не должны рассматриваться как ограничивающие описанный объект. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные здесь, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут очевидны специалистам в данной области техники и должны быть включены в истинный объем настоящего изобретения и могут быть выполнены без отхода от указанного объема.

Пример 1. Конструирование библиотек Tencon с рандомизированными петлями

Tencon (SEQ ID NO:1) представляет собой иммуноглобулиноподобный каркас, домен фибронектина типа III (FN3), сконструированный из консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 из тенасцина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патент США с № 8278199). Кристаллическая структура Tencon выявляет шесть петель, выставленных на поверхность, которые соединяют семь бета-цепей. Эти петли, или выбранные остатки в каждой петле, могут быть подвергнуты рандомизации для конструирования библиотек доменов фибронектина типа III (FN3), которые могут использоваться для отбора новых молекул, которые связываются со специфическими мишенями.

Tencon:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYTVSIIYGVKGGRHSNPLSAEFTT (SEQ ID NO:1)

Различные библиотеки были созданы с использованием каркаса Tencon и различных стратегий конструирования. В общем, библиотеки TCL1 и TCL2 дали хорошие связующие. Создание библиотек TCL1 и TCL2 подробно описано в публикации международной заявки на патент с № WO 2014081944 A2.

Конструирование библиотеки TCL1

Библиотека, сконструированная для рандомизации только FG-петли Tencon (SEQ ID NO:1), TCL1, была создана для использования с системой цис-дисплея (Jacobs et al., Protein Engineering, Design and Selection, 25: 107-117, 2012). В случае этой системы получают двухцепочечную ДНК, включающую последовательность для промотора Tac, кодирующую библиотеку Tencon последовательность, кодирующую RepA последовательность, цис-элемент и элемент ori. При экспрессии в системе транскрипции/трансляции in vitro образуется комплекс слитого белка Tencon-RepA, связанного в цис-положении с ДНК, с которой он кодируется. Комплексы, которые связываются с молекулой-мишенью, затем выделяют и амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано ниже.

Конструирование библиотеки TCL1 для использования с цис-дисплеем было достигнуто с помощью последовательных циклов ПЦР для получения конечных линейных двухцепочечных молекул ДНК в двух половинах; 5'-фрагмент содержит промотор и последовательности Tенсон, в то время как 3'-фрагмент содержит ген герА и цис-элемент и элемент ori. Эти две половины объединяют путем рестрикционного расщепления для получения всей конструкции. Библиотека TCL1 была сконструирована для включения случайных аминокислот только в FG-петлю Tенсон, KGGHRSN (SEQ ID NO:32). Кодоны NNS были использованы при конструировании этой библиотеки, что привело к возможному включению всех 20 аминокислот и одного стоп-кодона в FG-петлю. Библиотека TCL1 содержит шесть отдельных подбиблиотек, каждая из которых содержит рандомизированную FG-петлю различной длины, от 7 до 12 остатков, для дальнейшего увеличения разнообразия.

Библиотека TCL1 (SEQ ID NO:2)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYTVSIYGVX₇₋₁₂PLSAEFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇ представляют собой любую аминокислоту и

X₈, X₉, X₁₀, X₁₁ и X₁₂ представляют собой любую аминокислоты или делетированы.

Конструирование библиотеки TCL2

Была сконструирована библиотека TCL2, в которой BC- и FG-петли Tенсон были подвергнуты рандомизации, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В табл. 2 продемонстрировано распределение аминокислот в желаемых положениях петель в библиотеке TCL2. Спроектированное распределение аминокислот имело две цели. Во-первых, библиотека была смещена в сторону остатков, которые, по прогнозам, были структурно важными для свертывания и стабильности Tенсон на основе анализа кристаллической структуры Tенсон и/или моделирования гомологии. Например, в положении 29, как было определено, должно быть только подмножество гидрофобных аминокислот, поскольку этот остаток был спрятан в гидрофобной основе складки Tенсон. Второй уровень конструирования включал смещение распределения аминокислот в сторону распределения остатков, преимущественно обнаруживаемых в HCDR3 тяжелой цепи антител, для эффективного получения связующих с высоким сродством (Birtalan et al., J Mol Biol 377: 1518-28, 2008; Olson et al., Protein Sci 16: 476-84, 2007). Для достижения этой цели "спроектированное распределение" в табл. 1 относится к следующему распределению: 6% аланина, 6% аргинина, 3,9% аспарагина, 7,5% аспарагиновой кислоты, 2,5% глутаминовой кислоты, 1,5% глутамина, 15% глицина, 2,3% гистидина, 2,5% изолейцина, 5% лейцина, 1,5% лизина, 2,5% фенилаланина, 4% пролина, 10% серина, 4,5% треонина, 4% триптофана, 17,3% тирозина и 4% валина. В случае этого распределения нет метионина, цистеина и стоп-кодонов.

Библиотека TCL2 (SEQ ID NO:3)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈SFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSER

SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃SX₁₄X₁₅LSAEFTT;

где

X₁ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₂ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₃ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₄ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₅ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₆ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₇ представляет собой Phe, Ile, Leu, Val или Tyr;

X₈ представляет собой Asp, Glu или Thr;

X₉ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₁₀ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₁₁ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₁₂ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₁₃ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X₁₄ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr

или Val и

X₁₅ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val.

Таблица 2

Положение остатка	Остатки WT	Распределение в библиотеке TCL2
22	T	спроектированное распределение
23	A	спроектированное распределение
24	P	50% P+спроектированное распределение
25	D	спроектированное распределение
26	A	20% A+20% G=спроектированное распределение
27	A	спроектированное распределение
28	F	20% F, 20% I, 20% L, 20% V, 20% Y
29	D	33% D, 33% E, 33% T
75	K	спроектированное распределение
76	G	спроектированное распределение
77	G	спроектированное распределение
78	H	спроектированное распределение
79	R	спроектированное распределение
80	S	100%
81	N	спроектированное распределение
82	P	50% P+спроектированное распределение

* нумерация остатков основана на последовательности Tencon SEQ ID NO:1

Впоследствии эти библиотеки были улучшены различными способами, включая создание библиотек на стабилизированном каркасе Tencon (патент США № 8569227), который включает замены E11R/L17A/N46V/E86I (Tencon27; SEQ ID NO: 4) по сравнению с Tencon дикого типа, а также изменения положений, рандомизированных в BC- и FG-петлях. Tencon27 описан в публикации международной заявки на патент с № WO 2013049275. Исходя из этого, были созданы новые библиотеки, предназначенные для рандомизации только FG-петли Tencon (библиотека TCL9) или комбинации BC- и FG-петель (библиотека TCL7). Эти библиотеки были сконструированы для использования с системой цис-дисплея (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101: 2806-2810, 2004). Детали этого конструирования представлены ниже:

Стабилизированный Tencon (Tencon27) (SEQ ID NO:4)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

TCL7 (рандомизированные FG- и BC-петли) (SEQ ID NO:5)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉FDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPG
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉SNPLSAIFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅ и X₁₆ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и

X₇, X₈, X₉, X₁₇, X₁₈ и X₁₉ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или делетирован.

TCL9 (рандомизированная FG-петля) (SEQ ID NO:6)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGV X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ X₁₀X₁₁X₁₂SNPLSAIFTT;

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ и X₇ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y и X₈, X₉, X₁₀, X₁₁ и X₁₂ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или делетирован.

Для конструирования библиотеки фрагменты ДНК, кодирующие рандомизированные BC-петли (с длинами 6-9 положений) или FG-петли (с длинами 7-12 положений), были синтезированы с использованием технологии Slonomics (Sloning Biotechnology GmbH), чтобы контролировать распределение аминокислот в библиотеке и удалить стоп-кодона. Две различные совокупности молекул ДНК, рандомизирующие либо BC-петлю, либо FG-петлю, были синтезированы независимо и позднее объединены с использованием ПЦР для получения продукта в виде полной библиотеки.

Конструирование библиотек FG-петли (TCL9)

Была получена совокупность синтетических молекул ДНК, состоящих из 5' промотора Tас, за которым следует полная последовательность гена Tencon, за исключением рандомизированных кодонов в FG-петле (SEQ ID NO:26-31). Для рандомизации FG-петли все аминокислоты, кроме цистеина и метионина, были закодированы в равных процентах. Длины части с введенным разнообразием таковы, что они кодируют 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот в FG-петле. Подбиблиотеки каждой вариации длины были

синтезированы по отдельности в масштабе 2 мкг, а затем амплифицированы с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов Sloning-FOR (SEQ ID NO: 9) и Sloning-Rev (SEQ ID NO: 10).

3'-фрагмент библиотеки представляет собой константную последовательность ДНК, содержащую элементы для дисплея, включая сайт рестрикции PspOMI, кодирующую область гена *герА* и *cis*-элемент и элемент *ori*. Реакции ПЦР проводили для амплификации этого фрагмента с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen) в качестве матрицы с праймерами M13 прямого и M13 обратного. Полученные продукты ПЦР расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали в геле. Чтобы лигировать 5'-часть ДНК библиотеки с 3'-ДНК, содержащей ген *герА*, 2 пмоль (от ~540 до 560 нг) 5' ДНК лигировали с равным молярным количеством (~1,25 мкг) 3' ДНК *герА* в присутствии фермента NotI и PspOMI и лигазы T4 при 37°C в течение ночи. Лигированный продукт библиотеки амплифицировали, используя 12 циклов ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2250 (SEQ ID NO: 11) и DigLigRev (SEQ ID NO: 12). Для каждой подбиблиотеки полученную ДНК из 12 реакций ПЦР объединяли и очищали с помощью спин-колонки Qiagen. Выход для каждой подбиблиотеки TCL9 составлял от 32 до 34 мкг.

Конструирование библиотек FG/BC-петель (TCL7)

Библиотека TCL7 предоставляет библиотеку с рандомизированными BC- и FG-петлями Tenson. В этой библиотеке BC-петли длиной 6-9 аминокислот были смешаны комбинаторно с рандомизированными FG-петлями длиной 7-12 аминокислот.

Синтетические фрагменты Tenson BC6, BC7, BC8 и BC9 (SEQ ID NO: 13-16) были получены для включения гена Tenson, кодирующего N-концевую часть белка, вплоть до остатка VX включительно, так что BC-петля замещена 6, 7, 8 или 9 рандомизированными аминокислотами. Эти фрагменты были синтезированы до открытия мутаций L17A, N46V и E83I (CEN5243), но эти мутации были введены на этапах молекулярной биологии, описанных ниже. Чтобы объединить этот фрагмент с фрагментами, кодирующими рандомизированные FG-петли, были предприняты следующие шаги.

Сначала фрагмент ДНК, кодирующий промотор Tас и 5' последовательность Tenson вплоть до нуклеотида, кодирующего аминокислоту A17 (130mer-L17A, SEQ ID NO: 17), был получен с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222ext (SEQ ID NO: 18) и LS1114 (SEQ ID NO: 19). Это было сделано для включения мутации L17A в библиотеку (CEN5243). Затем фрагменты ДНК, кодирующие остатки R18-V75 Tenson включая рандомизированные BC-петли, были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием BC6, BC7, BC8 или BC9 в качестве матриц и олигонуклеотидов LS1115 (SEQ ID NO: 20) и LS1117 (SEQ ID NO: 21). Этот шаг в виде ПЦР представил сайт BsaI на 3'-конце. Эти фрагменты ДНК были впоследствии объединены с помощью перекрывающейся ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222ext и LS1117 в качестве праймеров. Полученный продукт ПЦР размером 240 п.н. объединяли и очищали с помощью набора для очистки ПЦР Qiagen. Очищенную ДНК расщепляли BsaI-HF и очищали в геле.

Фрагменты, кодирующие FG-петлю, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием FG7 (SEQ ID NO: 31), FG8 (SEQ ID NO: 30), FG9 (SEQ ID NO: 29), FG10 (SEQ ID NO: 28), FG11 (SEQ ID NO: 27) и FG12 (SEQ ID NO: 26) в качестве матриц с олигонуклеотидами SDG10 (SEQ ID NO: 22) и SDG24 (SEQ ID NO: 23) для включения сайта рестрикции BsaI и вариаций N46V и E86I (CEN5243).

Расщепленные фрагменты BC и фрагменты FG лигировали вместе в одну стадию с использованием тройственного лигирования. Были составлены четыре реакции лигирования в 16 возможных комбинациях, причем каждая реакция лигирования объединяла две длины BC-петли с 2 длинами FG-петли. Каждая реакция лигирования содержала ~300 нг общего фрагмента BC и 300 нг фрагмента FG. Эти 4 пула лигирований затем амплифицировали с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222 (SEQ ID NO: 24) и SDG28 (SEQ ID NO: 25). Затем 7,5 мкг каждого продукта реакции расщепляли с помощью NotI и очищали с помощью колонки для очистки ПЦР Qiagen. 5,2 мкг этой ДНК лигировали с равным молярным количеством фрагмента ДНК RepA (~14 мкг), расщепленного с помощью PspOMI, и продукт амплифицировали с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222.

Пример 2. Создание библиотек Tenson, имеющих альтернативные поверхности связывания

Выбор остатков, подвергаемых рандомизации в конкретной конструкции библиотеки, определяет общую форму создаваемой поверхности взаимодействия. Рентгено-кристаллографический анализ домена FN3, содержащего каркасный белок, выбранный для связывания мальтозосвязывающего белка (MBP) из библиотеки, в которой рандомизации были подвергнуты BC-, DE- и FG-петли, показал в значительной степени изогнутую поверхность соприкосновения, которая встраивается в активный центр MBP (Koide et al., Proc Natl Acad Sci USA 104: 6632-6637, 2007). В отличие от этого, было обнаружено, что каркасный белок анкириновых повторов, который был выбран для связывания с MBP, имеет гораздо более плоскую поверхность взаимодействия и связывается с внешней поверхностью MBP, отдаленной от активного центра (Binz et al., Nat Biotechnol 22: 575-582, 2004). Эти результаты предполагают, что форма поверхности связывания каркасной молекулы каркаса (изогнутая против плоской) может определять, какие белки-мишени или специфические эпитопы на этих белках-мишенях могут эффективно связываться с каркасом.

Опубликованные попытки конструирования белковых каркасов, содержащих домены FN3 для связывания белка, были основаны на конструировании смежных петель для связывания мишеней, что при-

водит к образованию изогнутых поверхностей связывания. Этот подход может ограничить число мишеней и эпитопов, доступных для таких каркасов.

Tencon и другие домены FN3 содержат две совокупности CDR-подобных петель, лежащих на противоположных сторонах молекулы, первая совокупность, образованная BC-, DE- и FG-петлями, и вторая совокупность, образованная AB-, CD- и EF-петлями. Две совокупности петель разделены бета-цепями, которые образуют центральную часть структуры FN3. Если изображение Tencon повернуть на 90°, можно увидеть альтернативную поверхность. Эта слегка вогнутая поверхность образована CD- и FG-петлями и двумя антипараллельными бета-цепями, бета-цепями С и F и называется здесь поверхностью C-CD-F-FG. Поверхность C-CD-F-FG может использоваться в качестве образца для конструирования библиотек поверхностей взаимодействия белковых каркасов путем рандомизации подмножества остатков, которые образуют поверхность. Бета-цепи имеют повторяющуюся структуру с боковой цепью каждого второго остатка, выставленной на поверхность белка. Таким образом, библиотека может быть создана путем рандомизации некоторых или всех выставленных на поверхность остатков в бета-цепях. При выборе подходящих остатков в бета-цепях присущая стабильность каркаса Tencon должна быть нарушена минимально, обеспечивая уникальную поверхность каркаса для взаимодействия с другими белками.

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO:7) была сконструирована в каркасе Tencon27 (SEQ ID NO:4).

Полное описание использованных для конструирования этой библиотеки способов описано в публикации заявки на патент США № US 2013/0226834.

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO:7) :

LPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIVLTVPGSERS

YDLTGLKPGTEYX₈VX₉IX₁₀GVKGGX₁₁X₁₂SX₁₃PLSAIFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂ и X₁₃ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или M.

Две бета-цепи, образующие поверхность C-CD-F-FG в Tencon27, имеют в общей сложности 9 выставленных на поверхность остатков, которые можно было подвергнуть рандомизации; в С-цепи: S30, L32, Q34, Q36; в F-цепи: E66, T68, S70, Y72 и V74, в то время как CD-петля имеет 6 потенциальных остатков: S38, E39, K40, V41, G42 и E43, а FG-петля имеет 7 потенциальных остатков: K75, G76, G77, H78, R79, S80 и N81. Выбранные остатки были выбраны для включения в конструкцию TCL14 из-за большего теоретического размера библиотеки, если бы все 22 остатка были подвергнуты рандомизации.

Для рандомизации были выбраны тринадцать положений в Tencon: L32, Q34 и Q36 в С-цепи, S38, E39, K40 и V41 в CD-петле, T68, S70 и Y72 в F-цепи, H78, R79 и N81 в FG-петле. В С- и F-цепях S30 и E66 не были подвергнуты рандомизации, поскольку они расположены сразу после CD- и FG-петель и, по-видимому, не являются частью поверхности C-CD-F-FG. Для CD-петли G42 и E43 не были подвергнуты рандомизации, так как глицин, обеспечивающий гибкость, может быть ценным в петлевых областях, а E43 находится на стыке поверхности. В случае FG-петли были исключены K75, G76, G77 и S80. Глицины были исключены по вышеуказанным причинам, в то время как тщательный осмотр кристаллических структур выявил, что S80 создает ключевые контакты с основой, чтобы помочь в образовании стабильной FG-петли. K75 отвернут от поверхности C-CD-F-FG и был менее привлекательным кандидатом для рандомизации. Хотя вышеупомянутые остатки не были подвергнуты рандомизации в исходной конструкции TCL14, они могли быть включены в последующие конструкции библиотек, чтобы обеспечить дополнительное разнообразие для *de novo* отбора или, например, для библиотеки созревания аффинности к отобранному мишень-специфическому наилучшему результату поиска в TCL14.

После получения TCL14 были созданы 3 дополнительные библиотеки Tencon с аналогичной конструкцией. Эти три библиотеки, TCL19, TCL21 и TCL23, подвергнуты рандомизации в тех же положениях, что и TCL14 (смотрите выше), однако распределение аминокислот, встречающихся в этих положениях, изменено (таблица 3). TCL19 и TCL21 были сконструированы с включением равного распределения 18 природных аминокислот в каждом положении (5,55% каждой), исключая только цистеин и метионин. TCL23 была сконструирована таким образом, что каждое рандомизированное положение приблизительно соответствует распределению аминокислот, обнаруживаемому в петлях HCDR3 функциональных антител (Birtalan et al., J Mol Biol 377: 1518-1528, 2008), как описано в табл. 2. Как и в случае библиотеки TCL21, цистеин и метионин были исключены.

Была создана еще одна дополнительная библиотека для расширения потенциальной поверхности связывания мишеней других библиотек. В этой библиотеке TCL24 рандомизации были подвергнуты 4 дополнительных положения Tencon по сравнению с библиотеками TCL14, TCL19, TCL21 и TCL23. Эти положения включают N46 и T48 из D-цепи и S84 и I86 из G-цепи. Положения 46, 48, 84 и 86 были выбраны, в частности, поскольку боковые цепи этих остатков выставлены на поверхность из бета-цепей D и G и находятся структурно рядом с рандомизированными частями С- и F-цепей, таким образом увеличивая площадь поверхности, доступную для связывания с белками-мишенями. Распределение аминокислот, используемое в каждом положении, в случае TCL24 идентично распределению, описанному для TCL19 и TCL21 в табл. 2.

Библиотека TCL24 (SEQ ID NO:8)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₀VX₁₁IX₁₂GVKGGX₁₃X₁₄SX₁₅PLX₁₆AX₁₇FTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂ и X₁₃ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V или W.

Таблица 3. Частота (%) аминокислоты в каждом рандомизированном положении для TCL21, TCL23 и TCL24

Аминокислота	TCL19	TCL21	TCL23	TCL24
Ala	5,6	5,6	6,0	5,6
Arg	5,6	5,6	6,0	5,6
Asn	5,6	5,6	3,9	5,6
Asp	5,6	5,6	7,5	5,6
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0
Gln	5,6	5,6	1,5	5,6
Glu	5,6	5,6	2,5	5,6
Gly	5,6	5,6	15,0	5,6
His	5,6	5,6	2,3	5,6
Ile	5,6	5,6	2,5	5,6
Leu	5,6	5,6	5,0	5,6
Lys	5,6	5,6	1,5	5,6
Met	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	5,6	5,6	2,5	5,6
Pro	5,6	5,6	4,0	5,6
Ser	5,6	5,6	10,0	5,6
Thr	5,6	5,6	4,5	5,6
Trp	5,6	5,6	4,0	5,6
Tyr	5,6	5,6	17,3	5,6
Val	5,6	5,6	4,0	5,6

Создание библиотек TCL21, TCL23 и TCL24

Библиотека TCL21 была создана с использованием технологии создания библиотеки Colibra (Isogenica) для контролирования распределения аминокислот. Фрагменты генов TCL19, TCL23 и TCL24 были получены с использованием технологии Slonomics (Morphosys) для контролирования распределения аминокислот. ПЦР использовали для амплификации каждой библиотеки после первоначального синтеза с последующим лигированием с геном для RepA, чтобы использовать его в отборах с использованием системы цис-дисплея (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101: 2806-2810, 2004), как описано выше для библиотек петель.

Пример 3. Отбор доменов фибронектина типа III (FN3), которые связываются с человеческим сывороточным альбумином.

Скрининг библиотеки

Цис-дисплей использовали для отбора доменов, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином, из библиотек TCL14, TCL19, TCL21, TCL23 и TCL24. Альбумин сыворотки человека и кролика, очищенный из сыворотки (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), биотинилировали с использованием стандартных методов и использовали для пэннинга. Для транскрипции и трансляции *in vitro* (ITT) 3 мкг библиотечной ДНК инкубировали с 0,1 mM аминокислот в полном составе, 1X предварительно смешанными компонентами S30 и 15 мкл экстракта S30 (Promega) в общем объеме 50 мкл и инкубировали при 30°C. Через 1 ч добавляли 375 мкл раствора для блокирования ((0,1% казеина (Thermo Fisher, Rockford, IL)), 100 мг/мл ДНК спермы сельди (Promega, Madison, WI), 1 мг/мл гепарина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) и реакционную смесь инкубировали на льду в течение 15 мин. Для отбора добавляли биотинилированный антиген в концентрациях 400 нМ (цикл 1), 200 нМ (циклы 2 и 3) и 100 нМ (циклы 4 и 5). Связанные члены библиотеки извлекали, используя магнитные шарики с нейтравидином (Thermo Fisher, Rockford, IL) (циклы 1, 3 и 5) или магнитные шарики со стрептавидином (Promega, Madison, WI) (циклы 2 и 4), и несвязанные члены библиотеки удалялись путем промывки шариков 5-14 раз 500 мкл PBST с последующими 2 промывками 500 мкл PBS. Дополнительные циклы отбора были выполнены для идентификации каркасных молекул с увеличенным сродством. Вкратце, результаты отбора после цикла 5 были приготовлены, как описано выше, и подвергнуты дополнительным повторным циклам отбора со следующими изменениями: время инкубации с биотинилированным антигеном было уменьшено с 1 ч до 15 мин, а время захвата шариков было уменьшено с 20 до 15 мин, концентрация bt-HSA была уменьшена до 25 нМ (циклы 6 и 7) или 2,5 нМ (циклы 8 и 9), и дополнительную промывку в течение 1 ч осуществляли в присутствии избыточного количества небитинилированного белка-мишени. Цель этих изменений со-

стояла в одновременном отборе связующих с потенциально более высокой скоростью ассоциации и более медленной скоростью диссоциации, что обеспечивает существенно более низкую K_D .

После пэннинга отобранные домены FN3 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов Tcon6 (SEQ ID NO:33) и Tcon5shortE86I (SEQID NO: 34), субклонировали путем отжига в pET15-LIC и трансформировали в клетки BL21-GOLD (DE3) (Agilent, Santa Clara, CA) для растворимой экспрессии в *E.coli*, используя стандартные методы молекулярной биологии. Отдельные клоны отбирали и выращивали до насыщения в 1 мл LB с ампициллином в планшетах с 96 глубокими лунками при 37°C. На следующий день 25 мкл переносили в 1 мл свежей среды LB-Amp в планшетах с 96 глубокими лунками и выращивали при 37°C в течение 2 ч. IPTG добавляли в конечной концентрации 1 mM, и экспрессию белка индуцировали при 30°C в течение 16 ч. Клетки собирали центрифугированием и затем лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) с добавлением 0,2 мг/мл в конечной концентрации лизоцима куриного яичного белка (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Бактериальные лизаты осветляли центрифугированием, и супернатанты переносили в новые планшеты с 96 глубокими лунками и проверяли на связывание с белком-мишенью с помощью ELISA.

Отбор доменов FN3, которые связываются с человеческим сывороточным альбумином

Иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) проводили на отдельных клонах из отобранных результатов пэннинга с целью идентификации связующих для человеческого сывороточного альбумина. Планшеты Maxisorp (Nunc, Rochester, NY) покрывали 5 мкг HSA, rabSA или 5 мкг/мл овальбумина в течение ночи (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), промывали Трис-буферным солевым раствором, pH 7,4 с 0,05% Tween-20 (TBST) и блокировали с использованием Starting Block T20 (Thermo Fisher, Rockford, IL). Осветленные бактериальные лизаты (описанные выше) вносили в лунки покрытых HSA, rabSA и овальбумином планшетов. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, промывали TBST, и связанный Centygrin детектировали с помощью pAb25-HRP (Janssen R&D, Springhouse PA) и хемилюминесцентного субстрата POD (Roche, Indianapolis, IN), используя устройство для считывания планшетов Molecular Devices M5. Лучшие результаты поиска определяли как сигнал связывания человеческого сывороточного альбумина: сигнал связывания овальбумина >10.

Клоны были дополнительно охарактеризованы в анализе ELISA, описанном выше, в отношении связывания с различными конструкциями доменов человеческого сывороточного альбумина и в отношении перекрестной реактивности с альбуминами различных видов: доменом I альбумина (Albumin Biosciences, Huntsville, AL), доменом II (Albumin Biosciences, Huntsville, AL), доменом III (Albumin Biosciences, Huntsville, AL), доменом I-II (Albumin Biosciences, Huntsville, AL), сывороточным альбумином макаки-резус (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и мышинным сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Домены I, II и III использовались для покрытия в концентрации 1 мкг/мл, домен I-II в концентрации 2 мкг/мл, а полноразмерные альбумины резус-макаки и мыши - в концентрации 3 мкг/мл вместе с человеческим сывороточным альбумином, служащим в качестве положительного контроля связывания в концентрации 3 мкг/мл. Специфичности альбуминсвязывающих доменов - отобранных доменов FN3 продемонстрирована в табл. 4. В табл. 5 представлены полноразмерные аминокислотные последовательности отобранных доменов FN3.

Таблица 4. Специфичности альбуминсвязывающих доменов отобранных доменов FN3

ID клона	Специфичность альбуминсвязывающих доменов
ALB-E05	III
ALB-E07	I
ALB-H9	III

Таблица 5. Аминокислотные последовательности отобранных доменов FN3

ID клона	SEQ ID NO:	Последовательность
ALB-E05	51	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIEYWEDDVGGGEAIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYDVYI LGVKGGWESGPLSAIFTT
ALB-E07	52	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKILYEEYLVFGEAIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYWVAIW GVKGGQVSGTLSAIFTT
ALB-H9	53	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIEYWEQSIIVGEAIVLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYRVWIYG VKGNDWPLSAIFTT

Экспрессия и очистка в малых масштабах идентифицированных доменов FN3, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином

Отобранные клоны с доменами FN3 отбирали и выращивали до насыщения в 1 мл бульона Лурия (LB) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (среда LB-Amp) в планшетах с 96 глубокими лунками при 37°C. На следующий день 25 мкл переносили в 5 мл свежей среды LB-Amp в планшетах с 24 глубокими

лунками и выращивали при 37°C в течение 2 ч. IPTG добавляли в конечной концентрации 1 мМ, и экспрессию белка индуцировали при 30°C в течение 16 ч. Клетки собирали центрифугированием и лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) с добавлением 0,2 мг/мл в конечной концентрации лизоцима куриного яичного белка (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Бактериальные лизаты осветляли центрифугированием, и супернатанты переносили в новые планшеты с 96 глубокими лунками. His-меченные домены FN3 очищали с использованием 96-луночного планшета Ni-NTA Multitrap Plate в соответствии с рекомендациями производителей (GE Lifesciences, Piscataway, NJ).

Анализ с использованием гель-хроматографии

Гельпроникающую хроматографию (SEC) использовали для определения состояния агрегации доменов FN3, связывающихся с сывороточным альбумином человека. Аликвоты (10 мкл) каждого очищенного домена FN3 инъецировали в колонку Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин в подвижной фазе PBS, pH 7,4. Элюирование из колонки контролировали по оптической плотности при 280 нм. Домены FN3, которые демонстрировали высокие уровни агрегации при проведении SEC, были исключены из дальнейшего анализа.

Пример 4. Характеристика доменов FN3, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином

Иммунопреципитация комплексов человеческий сывороточный альбумин-домен FN3

Для оценки функциональности связывающих отобранные домены FN3 были проверены на их способность к образованию комплексов с эндогенным альбумином в нормальной сыворотке. Чтобы убедиться в сохранении связывания с альбумином в случае присоединения отобранных доменов FN3 или к N-, или к C-концу другого домена FN3, были получены гены бивалентных FN3 для создания конструкций ALB18, ALB30, ALB21, ALB33, ALB34 и ALB35 (табл. 6).

Таблица 6. Бивалентные конструкции, исследованные на предмет сохранения связывания с альбумином

ID клона	Домен 1 FN3	Линкер	Домен 2 FN3
ALB18	Tc25	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	ALB-E05
ALB30	ALB-E05	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	Tc25
ALB21	ALB-E07	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	Tc25
ALB33	Tc25	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	ALB-E07
ALB34	Tc25	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	ALB-H9
ALB35	ALB-H9	(G4S) 4 (SEQ ID NO: 71)	Tc25

His₆-меченные (SEQ ID NO: 72) на C-конце бивалентные домены FN3 (0,25-2,0 мг/мл в 1X DPBS без кальция или магния) смешивали в объемном соотношении 1:1 с нормальной сывороткой и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре для допуска связывания с эндогенным альбумином в сыворотке. Комплексы His₆-меченный (SEQ ID NO: 72) домен FN3-альбумин извлекали из сыворотки с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC), используя колонки 200+ PhyTip, содержащие 5-мкл слой смолы (PureSpeed™ Protein Tip IMAC от Rainin Instrument LLC; Oakland, CA), предварительно уравновешенные с использованием буфера 50 мМ Трис, pH 7,0, содержащего 500 мМ NaCl и 10 мМ имидазол. Несвязанные сывороточные белки удаляли путем тщательного промывания смолы буфером для уравнивания. Связанный белок элюировали с использованием 25-100 мкл буфера для элюции (50 мМ Трис, pH 7,0, содержащего 500 мМ NaCl и 250 мМ имидазол, pH 7,5). Элюаты анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ (SDS-PAGE) на соосаждение альбумина. Гели после SDS-PAGE окрашивали коллоидным Кумасси. Дорожки, содержащие альбуминсвязывающие домены FN3, содержали интенсивные полосы, соответствующие молекулярной массе сывороточного альбумина плюс домены FN3. Напротив, альбумин не образовывал комплексы, когда Tencon25 (SEQ ID NO: 73), домен FN3, не имеющий сродства к сывороточному альбумину, извлекали из сыворотки с помощью очистки с использованием IMAC (см. фиг. 2).

Фармакокинетика альбуминсвязывающих доменов FN3 у яванских макаков

Исследования in vivo проводили с ALB18 и ALB33. Исследуемые образцы поставлялись в проводящую исследование лабораторию в концентрации 2,0 мг/мл и хранились при -70±10°C. Домены FN3 оттаивали при комнатной температуре за 24 ч до введения доз и хранили при 2-8°C. В день введения доз исследуемые образцы нагревали до комнатной температуры. Девять не подвергавшихся ранее воздействию самок яванских макаков весом от 2,0 до 4,0 кг на момент введения доз были разделены на 3 группы. Домены FN3 вводили с помощью внутривенной (IV) болюсной инъекции (планируемое время 1-3 мин в зависимости от общего объема дозы) в день 1 в дозе 2 мг/кг. Объем каждой введенной дозы (мл) основывался на весе тела отдельного животного, зафиксированном за 1-2 дня до введения дозы. Приблизительно 1 мл цельной крови собирали из периферического сосуда в день 1 до введения дозы, через 10 мин и через 6 и 24 ч после введения дозы. Дополнительные образцы были собраны в дни 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14 и 21 примерно в одно и то же время дня. Все образцы крови были собраны в пробирки для отделения сыворотки

без антикоагулянта. Образцы крови сворачивались в течение 30 мин, и затем их центрифугировали в центрифуге с охлаждением в течение 15 мин. Приблизительно 1 мл сыворотки переносили в две пробирки Eppendorf (по 0,5 мл каждая) и хранили при -65°C до отправки спонсору.

H9 оценивали следующим образом. Трем не подвергавшимся ранее воздействию самцам яванских макаков весом в диапазоне от 2,2 до 4,4 кг вводили дозу 1 мг/кг H9 (0,5 мг/мл, приготовленного в PBS) при внутривенной болюсной инъекции 2 мл/кг. Образцы крови (приблизительно 1 мл) собирали из головной или бедренной вены в пробирки BD Vacutainer® SST™ объемом 3,5 мл (кат. № 367957) без антикоагулянта. Пробы отбирали в следующие моменты времени: перед введением дозы ($t=0$) и через 10 мин, 1, 6, 24, 48, 72 ч (день 4), 168 ч (день 8), 240 ч (день 11), 336 ч (день 15) и 504 ч (день 22) после введения дозы. Образцы крови в каждый момент времени свертывались в течение 30–60 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием в течение 15 мин при комнатной температуре. Приблизительно 0,5 мл сыворотки переносили в предварительно помеченную полипропиленовую микропробирку и сразу же помещали на сухой лед перед хранением при -70°C или ниже. Образцы сыворотки отправлялись в сухом льду.

Для определения концентрации доменов FN3, присутствующих в образцах сыворотки, стандартные кривые для альбуминсвязывающих доменов FN3 H9, ALB18 и ALB33 были приготовлены в концентрации 300 нг/мл и последовательно разведены в 3 раза в буфере для анализа (10% контрольной сыворотке от не подвергавшимся ранее воздействию яванских макаков (Bioreclamation) в блокирующем буфере Super Block T20 (TBS) (Thermo Scientific)) для кривой по 11 точкам. Все исследуемые образцы сыворотки оттаивали при комнатной температуре и готовили в буфере для анализа в разведении 1:10 и дополнительно последовательно разводили, используя 5-кратные разведения в буфере для анализа. Гомогенную мастер-смесь для захвата и детектирования получали с использованием биотинилированных антител для захвата и детектирования, помеченных рутением (поликлонального антитела против домена FN3 pab139, Janssen Pharmaceuticals), приготовленных в Super Block до 0,625 мкг/мл. 40 мкл мастер-смеси и 10 мкл разведенных образцов, стандартов или контролей добавляли в 96-луночные планшеты с конъюгированными со стрептавидином частицами золота (Mesoscale Discovery). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Планшеты промывали с использованием 300 мкл TBS-T, 0,05% Tween-20 (Sigma) и промокали досуха. 1X раствор Read Buffer T с поверхностно-активным веществом (Mesoscale Discovery) готовили в дистиллированной воде. Буфер для считывания добавляли в планшеты для анализа в количестве 150 мкл/лунку и электрохемилюминесценцию измеряли, используя считывающее устройство QuickPlex SQ 120 (Mesoscale Discovery).

Стандартные кривые были построены в GraphPad Prism путем преобразования осей X и Y в $X=\log(X)$ и $Y=\log(Y)$. Нелинейный регрессионный анализ (подбор кривой) был выполнен с использованием сигмоидальной кривой доза-ответ (изменяемого наклона); неизвестные были интерполированы за пределами стандартной кривой. Чтобы скорректировать начальное преобразование, средние интерполированные результаты были преобразованы с использованием $X=10^X$ и $Y=10^Y$. Линейный участок стандартной кривой определяли на глаз. Все интерполированные концентрации были скорректированы с учетом коэффициента разведения, используемого в анализе. Конечную концентрацию определяли путем усреднения действительных результатов для всех разведений и перевода из нг/мл в нМ.

Для фармакокинетического анализа использовали расширение PKSolver для Excel (Zhang, Y. et al. (2010) Comput. Methods Programs Biomed., 99 306-314). Модельно-независимый анализ проводили для каждого животного. Период полужизни и клиренс для трех животных для каждой конструкции усредняли для определения окончательных результатов. Фармакокинетические данные для альбуминсвязывающих доменов FN3 представлены на фиг. 2 и в табл. 7. Связующие для домена 3 альбумина, H9 и ALB18 показали сходные профили экспозиции и конечные значения периода полужизни (33–47 ч). Связующее для домена 1 альбумина ALB33 демонстрирует промежуточную экспозицию и конечное время полужизни, составляющее приблизительно 26 ч.

Таблица 7. Фармакокинетические свойства альбуминсвязывающих доменов FN3 у яванских макаков, представленные в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение

ID клона	Специфичность альбумин-связывающего домена	Период полужизни (ч)	Клиренс (мг/кг) (нмоль/л) / ч
ALB18	III	$46,7 \pm 3,6$	$1,08\text{E}-05 \pm 1,07\text{E}-06$
ALB33	I	$25,8 \pm 3,4$	$7,59\text{E}-05 \pm 1,20\text{E}-05$
ALB-H9	III	$32,9 \pm 2,8$	$9,74\text{E}-02 \pm 5,30\text{E}-03$
Tencon2 5	нет	$2,5 \pm 0,7$	$1,26\text{E}-03 \pm 1,0\text{E}-03$

Информация о последовательности

SEQ ID NO:1=исходная последовательность Tencon

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT

SEQ ID NO:2=Библиотека TCL1

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGV(X)₇₋₁₂PLSAEFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇ представляет собой любую аминокислоту иX₈, X₉, X₁₀, X₁₁ и X₁₂ представляют собой любую аминокислоту или делетированы.

SEQ ID NO:3=Библиотека TCL2

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈SFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSER
SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃SX₁₄X₁₅LSAEFTT;

где

X₁ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₂ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₃ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₄ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₅ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₆ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₇ представляет собой Phe, Ile, Leu, Val или Tyr;X₈ представляет собой Asp, Glu или Thr;X₉ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₁₀ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₁₁ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₁₂ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₁₃ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;X₁₄ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val иX₁₅ представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val.

SEQ ID NO:4=Стабилизированный Tencon (Tencon 27)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO:5=TCL7 (FG- и BC-петли)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉FDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉SNPLSAIFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅ и X₁₆ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y иX₇, X₈, X₉, X₁₇, X₁₈ и X₁₉ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или делетированы.

SEQ ID NO:6=TCL9 (FG-петля)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGV X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ X₁₀X₁₁X₁₂SNPLSAIFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ и X₇ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y иX₈, X₉, X₁₀, X₁₁ и X₁₂ представляет собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или делетирован.

SEQ ID NO:7=Библиотека TCL14
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIVLTVPGSERS
 YDLTGLKPGTEYX₈VX₉IX₁₀GVKGGX₁₁X₁₂SX₁₃PLSAIFTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂ и X₁₃ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или M.

SEQ ID NO:8=Библиотека TCL24
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSE
 RSYDLTGLKPGTEYX₁₀VX₁₁IX₁₂GVKGGX₁₃X₁₄SX₁₅PLX₁₆AX₁₇FTT;

где

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₁₀, X₁₁, X₁₂ и X₁₃ представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V или W.

SEQ ID NO:9=Sloning-FOR
 GTGACACGGCGGTTAGAAC
 SEQ ID NO: 10=Sloning-REV
 GCCTTTGGGAAGCTTCTAAG
 SEQ ID NO:11=POP2250
 CGGCGGTTAGAACGCGCTACAATTAATAC
 SEQ ID NO:12=DigLigRev
 CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
 SEQ ID NO:13=BC9
 GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCTGATCCAGTACCAG
 GAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACC
 TGACCGGTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCC
 AAAGGC
 SEQ ID NO:14=BC8
 GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCTGATCCAGTACCAGGAA
 TCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGA
 CCGGTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAA
 GGC
 SEQ ID NO:15=BC7
 GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCTGATCCAGTACCAGGAATCT
 GAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCG
 GTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC

SEQ ID NO:16=BC6
 GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
 AAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
 TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC

SEQ ID NO:17=130mer-L17A
 CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAT
 CATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCTA
 CCATGCTG

SEQ ID NO:18=POP222ext
 CGG CGG TTA GAA CGC GGC TAC AAT TAA TAC

SEQ ID NO:19=LS1114
 CCA AGA CAG ACG GGC AGA GTC TTC GGT AAC GCG AGA AAC AAC CAG
 GTT TTT CGG CGC CGG CAG CAT GGT AGA TCC TGT TTC

SEQ ID NO:20=LS1115
 CCG AAG ACT CTG CCC GTC TGT CTT GG

SEQ ID NO:21=LS1117
 CAG TGG TCT CAC GGA TTC CTG GTA CTG GAT CAG GAA AGA GTC GAA

SEQ ID NO:22=SDG10
 CATGCGGTCTCTCCGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTCCTGACCGTTCCGGGT

SEQ ID NO:23=SDG24
 GGTGGTGAAGATCGCAGACAGCGGGTTAG

SEQ ID NO:24=POP2222
 CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC

SEQ ID NO:25=SDG28
 AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCACCGCCGGTGGTGAAGATCGCAG
 AC

SEQ ID NO:26=FG12
 GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
 TCTGTCTTGGACCGCGCCGACGCGCGTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
 AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
 TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCAC
CATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:27=FG11

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
TCTGTCTTGGACCGCGCCGACGCGCGGTTGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
TGAAACCGGTTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCACCAT
GGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:28=FG10

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
TCTGTCTTGGACCGCGCCGACGCGCGGTTGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
TGAAACCGGTTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCACCATGGC
AGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:29=FG9

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
TCTGTCTTGGACCGCGCCGACGCGCGGTTGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
TGAAACCGGTTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGC
GGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:30=FG8

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
TCTGTCTTGGACCGCGCCGACGCGCGGTTGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
TGAAACCGGTTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGCGGT
TCTAGTCTAGCGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:31=FG7

GTGACACGGCGGTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
GATCTACCATGTGCGGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG
TCTGTCTTGGACGCGCCGACGCGCGGTTGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTC
TAACCCGCTGTCTGCGATCTTCACCACCGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGCGGTTCT
AGTCTAGCGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO:32=FG-петля Tencon

KGGHRSN

SEQ ID NO:33=Tcon 6

AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC

SEQ ID NO:34=Tcon5E86Ishort

GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TGA

TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG

SEQ ID NO:35=C-цепь исходного Tencon

Sfliqyqe

SEQ ID NO:36=C-цепь ALB-E05

sfQiEyWe

SEQ ID NO:37=C-цепь ALB-E07

sfKiLyEe

SEQ ID NO:38=C-цепь ALB-H9

sfHiEyWe

SEQ ID NO:39=CD-петля исходного Tencon

Sekvge

SEQ ID NO:40=CD-петля ALB-E05

DDVGge

SEQ ID NO:41=CD-петля ALB-E07

YLVFge

SEQ ID NO:42=CD-петля ALB-H9

QSIVge

SEQ ID NO:43=F-цепь исходного Tencon

Eytsiygvk

SEQ ID NO:44=F-цепь ALB-E05
 eyDvYiLgvk
 SEQ ID NO:45=F-цепь ALB-E07
 eyWvAiWgvk
 SEQ ID NO:46=F-цепь ALB-H9
 eyRvWiYgvk
 SEQ ID NO:47=FG-петля исходного Tencon
 Gghrsnp
 SEQ ID NO:48=FG-петля ALB-E05
 ggWEsGP
 SEQ ID NO:49=FG-петля ALB-E07
 ggQVsGT
 SEQ ID NO:50: FG-петля ALB-H9
 ggNDsWP
 SEQ ID NO:51=ALB-E05
 LPAPKNLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDSFQIEYWEDDVGGEAIVLTVPGSERSYDLT
 GLKPGTEYDVYILGVKGGWESGPLSAIFTT
 SEQ ID NO:52=ALB-E07
 LPAPKNLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDSFKILYEEYLVFGEAIVLTVPGSERSYDLT
 GLKPGTEYWVAIWGVKGGQVSGTLSAIFTT
 SEQ ID NO:53=ALB-H9
 LPAPKNLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDSFHIEYWEQSIVGEAIVLTVPGSERSYDLT
 GLKPGTEYRVWIIYGVKGGNDSWPLSAIFTT
 SEQ ID NO:54=(GS)₂
 GSGS
 SEQ ID NO:55=(GGGS)₂
 GGGSGGGS
 SEQ ID NO:56=(GGGS)₂
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
 SEQ ID NO:57=(AP)₂
 APAP
 SEQ ID NO:58=(AP)₅
 APAPAPAPAP
 SEQ ID NO:59=(AP)₁₀
 APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
 SEQ ID NO:60=(AP)₂₀

APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP

SEQ ID NO:61=A (EAAAK)₅AAA

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA

SEQ ID NO:62=Альбумин сыворотки человека

KWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRDAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKALVLIIFAQYLLQCCPF
EDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPPLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAA
FTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEF
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE
VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNR
RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVM
DDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO:63=Альбумин сыворотки яванского макака

KWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRTHKSEVAHRFKDLGEEHFKGLVLVAFSQYLLQCCPF
EEHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPPLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEATFLKKLYEVARRHPYFYAPELLFFAARYKAA
FAECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGDRAFAKAWAVARLSQKFPKAEF
AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADRADLAKYMCENQDSISSKLKECCDKPLLEKSHCLAE
VENDEMPADLPSLAADYVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVMLLLRLAKAYEAT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFQPLVEEPQNLVKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGAKCKKLPEAKRMPCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKVTCKCTESLVNR
RPCFSALELDEAYVPKAFNAETFTFHADMCTLSEKERQVKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKGVN
DNFAAFVEKCKKADDKKACFAEEGPKFVAASQAALA

SEQ ID NO:64=Последовательность нуклеиновой кислоты ALB-E05

TTGCCGGCCCCGAAGAACCTGGTCGTGAGCCGTGTTACCGAGGACAGCGCGCTCTGAG
CTGGACCGCACCGGACGCGCGCTTTGATTCGTTTCAGATTGAGTATTGGGAAGATGACGTGGGT
GGTGAGGCTATCGTGCTGACCGTCCCGGGTAGCGAGCGCAGCTACGATCTGACGGGTCTGAAAC
CGGGTACCGAGTACGACGTGTACATTTTGGGTGTTAAAGGTGGCTGGGAGAGCGGTCCGCTGTC
AGCAATCTTTACGACG

SEQ ID NO:65=Последовательность нуклеиновой кислоты ALB-E07

CTGCCGGCCCCGAAGAACCTGGTCGTGAGCCGTGTTACCGAGGACAGCGCGCTCTGAG
CTGGACCGCACCGGACGCGCGCTTTGATTCGTTTAAAGATTCTGTATGAAGAATACCTGGTGTTT
GGTGAGGCTATCGTGCTGACCGTCCCGGGTAGCGAGCGCAGCTACGATCTGACGGGTCTGAAAC
CGGGTACCGAGTACTGGGTGGCGATTGGGGTGTTAAAGGTGGCCAGGTGAGCGGCACCTGAG
CGCAATCTTTACGACG

SEQ ID NO:66=Последовательность нуклеиновой кислоты ALB-H9

ATGTTGCCGGCCCCGAAGAACCTGGTCGTGAGCCGTGTTACCGAGGACAGCGCGCTCT
GAGCTGGACCGCACCGGACGCGCGCTTTGATTCGTTTCACATTGAGTATTGGGAACAGAGCATC
GTGGGTGAGGCTATCGTGCTGACCGTCCCGGGTAGCGAGCGCAGCTACGATCTGACGGGTCTGA
AACCGGGTACCGAGTACCGCGTGTGGATTTACGGTGTTAAAGGTGGCAATGACAGCTGGCCGCT
GTCAGCAATCTTTACGACG

SEQ ID NO:67=Tencon25

LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT
GLKPGTEYTVSIYGVKGHRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO:68=3-ий домен FN3 в тенасцине С человека

DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEENQYSIGN
LKPDTYEYVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO:69=Фиброн

LDAPTDLQVTNVTDTSTIVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPSSSTSVTIT
GLTPGVEYVVSLYALKDNQESPLVGTQTT

SEQ ID NO:70=10-ый домен FN3 в фибронектине человека

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATI
SGLKPGVDYITIVYAVTGRGDSFASKPISINYRT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, имеющую 1, 2, 3 или 4 замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53.

2. Выделенный домен FN3 по п.1, где период полужизни в сыворотке домена FN3 превышает по меньшей мере в 10 раз период полужизни в сыворотке белка, включающего аминокислотную последовательность Tenscon25 SEQ ID NO: 67.

3. Выделенный домен FN3 по п.1, где период полужизни в сыворотке домена FN3 составляет по меньшей мере приблизительно 25 ч у яванского макака.

4. Выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по п.1.

5. Вектор, включающий полинуклеотид по п.4.

6. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.5.

7. Способ получения домена FN3, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина по п.6 в условиях, при которых экспрессируется домен FN3, и очистку домена FN3.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая домен FN3 по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ обнаружения присутствия человеческого сывороточного альбумина в биологическом образце, включающий получение биологического образца от субъекта, приведение биологического образца в контакт с доменом FN3 по п.1, присоединенным к метке, которая может быть детектирована, где метка, которая может быть детектирована, представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента, и оценку связывания биологического образца с доменом FN3, используя известный способ обнаружения, пригодный для метки, которая может быть детектирована.

10. Выделенная биспецифичная молекула FN3, содержащая первый домен FN3 и второй домен FN3, причем первый домен FN3 включает домен FN3 по п.1, а второй домен FN3 связывается с белком-мишенью, отличным от человеческого сывороточного альбумина.

11. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 по меньшей мере на 97, 98 или 99% идентичен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53.

12. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет 1, 2, 3 или 4 замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53.

13. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

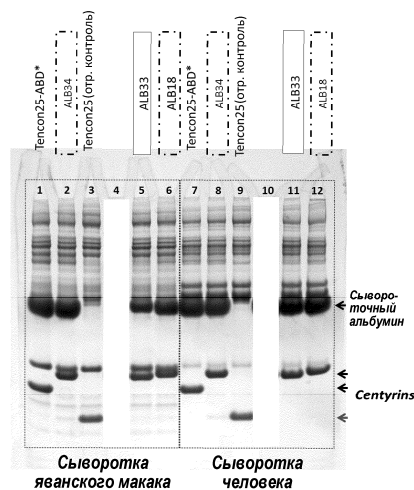
14. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 по меньшей мере на 97% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

15. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 по меньшей мере на 98% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

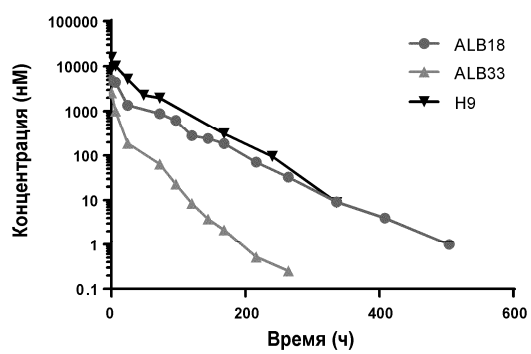
16. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

17. Выделенный домен FN3 по п.1, где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

18. Выделенный домен фибронектина типа III (FN3) по п.1, где 1, 2, 3 или 4 замены могут происходить в остатках 32, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 68, 70, 72, 78, 79, 81, 82 или любой их комбинации.



Фиг. 1



Фиг. 2

