

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040085**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.19

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

(21) Номер заявки
201691589

(22) Дата подачи заявки
2015.03.19

(54) **СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ОСНОВАННЫЕ НА ФИБРОНЕКТИНЕ КАРКАСНЫЕ МОЛЕКУЛЫ**

(31) **61/955,975; 62/084,270**

(56) **WO-A1-2011130354**

(32) **2014.03.20; 2014.11.25**

WO-A2-2011150133

(33) **US**

FR-A1-2819809

(43) **2017.02.28**

US-A1-2010040646

(86) **PCT/US2015/021466**

WO-A2-2007062064

(87) **WO 2015/143156 2015.09.24**

US-A1-2005095604

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

US-A1-2003190740

(72) Изобретатель:
Липовсек Даса (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(57) В настоящем документе предусмотрены белки, содержащие основанный на фибронектине каркасный (FBS) домен, например молекулы $^{10}\text{Fn}_3$, которые специфически связываются с мишенью, и причем домен FBS связан на С-конце с областью, состоящей из PmX_n , где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту и где n означает 0 или целое число, равное по меньшей мере 1, и m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и причем фрагмент PmX_n обеспечивает улучшенное свойство домена FBS, например повышенную стабильность, по отношению к белку, который не связан с фрагментом PmX_n .

040085

B1

040085

B1

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 61/955975, поданной 20 марта 2014 г., и предварительной заявкой на патент США № 62/084270, поданной 25 ноября 2014 г., содержание которых специально включено в настоящий документ посредством отсылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Аднектины представляют собой класс терапевтических белков с высокой аффинностью и специфическими связывающими мишени свойствами, которые происходят от десятого домена фибронектина типа III человека ($^{10}\text{Fn3}$). В то время как $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа является чрезвычайно стабильным и растворимым, связывающие мишени варианты $^{10}\text{Fn3}$, которые содержат от 4 до 31 мутации последовательности дикого типа, значительно различаются по стабильности и растворимости. Другими словами, любые мутации последовательности дикого типа $^{10}\text{Fn3}$, даже если это необходимо для связывания мишени, несут в себе риск снижения стабильности белка. Следовательно, было бы желательным определение модификаций, которые могут быть внесены в последовательности дикого типа $^{10}\text{Fn3}$ для его стабилизации предпочтительно независимо от идентичности остатков, которые опосредуют связывание аднектина с его терапевтическими мишенями.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе предусмотрены стабилизированные основанные на фибронектине каркасные (FBS) белки, например Fn3, такие как молекулы $^{10}\text{Fn3}$ (например, молекулы $^{10}\text{Fn3}$ человека), которые присоединены своими С-концами к остатку, состоящему из аминокислотной последовательности PmXn , где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту, m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и n равно 0 или представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и где фрагмент PmXn усиливает по меньшей мере одну характеристику, например термостабильность, белков FBS.

Краткое описание графических материалов

На чертеже: изображение кристаллической структуры домена $^{10}\text{Fn3}$ человека (PDB ID: 1FNA) и белковой последовательности полипептида, видимой в структуре. Последние два определенных в структуре остатка, "E1", в представляющей интерес последовательности, показаны в виде черных сфер, непосредственно ниже по ходу транскрипции от С-концевой бета-цепи, G.

Подробное описание настоящего изобретения

Описания.

"Аминокислотный остаток" представляет собой оставшуюся часть аминокислоты, после потери молекулы воды (H^+ от азотистой стороны и OH^- от карбоновой стороны) при образовании пептидной связи.

Используемый в настоящем документе термин "домен $^{10}\text{Fn3}$ " или "фрагмент $^{10}\text{Fn3}$ ", или "молекула $^{10}\text{Fn3}$ " относится к $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа и его биологически активным вариантам, например биологически активным вариантам, которые специфически связываются с мишенью, такой как белок-мишень. Человеческий домен $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа содержать одну из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1-8. Биологически активные варианты человеческого домена $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа включают в себя домены $^{10}\text{Fn3}$, которые содержат по меньшей мере не более чем или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 или 45 изменений аминокислот, т.е. замен, добавлений или делеции, по отношению к домену $^{10}\text{Fn3}$, содержащему любую из SEQ ID NO: 1-8. Биологически активный вариант домена $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа также может содержать или содержать не более чем 1-3, 1-5, 1-10, 1-15, 1-10, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40 или 1-45 изменений аминокислот по отношению к домену $^{10}\text{Fn3}$, содержащему любую из SEQ ID NO: 1-8. Согласно некоторым вариантам осуществления биологически активный вариант домена $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа не содержит более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 или 45 изменений аминокислот, т.е. замен, добавлений или делеций, по отношению к домену $^{10}\text{Fn3}$, содержащему любую из SEQ ID NO: 1-8. Изменения аминокислот могут быть в области петли, в нити или в N-концевой или С-концевой области. Иллюстративные вырожденные аминокислотные последовательности $^{10}\text{Fn3}$, допускающие изменения аминокислот в областях петли, приведены в настоящем документе в виде SEQ ID NO: 9-16.

Под "полипептидом" подразумевается любая последовательность из двух или более аминокислот, независимо от длины, посттрансляционной модификации или функции. Полипептиды могут включать в себя природные аминокислоты и неприродные аминокислоты, такие как те, которые описаны в патенте США № 6559126, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Полипептиды также могут быть модифицированы любым из множества стандартных химических способов (например, аминокислота может быть модифицирована с помощью защитной группы; карбокси-концевая аминокислотная последовательность может быть превращена в концевую амидную группу, амино-концевой остаток может быть модифицирован с группами, например, повышения липофильности, или полипептид может быть химически гликозилирован или иным образом модифицирован с целью повышения стабильности или периода полураспада *in vivo*). Модификации полипептидов могут включать в себя прикрепление другой структуры, такой как циклическое соединение или другая молекула, к полипептиду, а также могут включать в себя полипептиды, которые содержат одну или несколько аминокислот в измененной конфигурации (т.е. R, или S, или L, или D).

Используемая в настоящем документе "область" домена $^{10}\text{Fn3}$ (или фрагмент или молекула) относится к любому из следующего: петля (AB, BC, CD, DE, EF и FG), Р-нить (A, B, C, D, E, F и G), N-конец (соответствующий аминокислотным остаткам 1-7 в SEQ ID NO: 1) или С-конец (соответствующий аминокислотным остаткам 93-94 в SEQ ID NO: 1).

"Петля, расположенная на северном полюсе" домена $^{10}\text{Fn3}$ (или фрагмента), относится к любой из петель BC, DE и FG домена $^{10}\text{Fn3}$.

"Петля, расположенная на южном полюсе" домена $^{10}\text{Fn3}$ (или фрагмента), относится к любой из петель AB, CD и EF домена $^{10}\text{Fn3}$.

"Каркасная область" относится к любой не относящейся к петле области домена $^{10}\text{Fn3}$ человека. Каркасная область включает в себя Р-нити A, B, C, D, E, F и G, а также N-концевую область (аминокислоты, соответствующие остаткам 1-7 в SEQ ID NO: 1) и С-концевую область (аминокислоты, соответствующие остаткам 93-94 в SEQ ID NO: 1).

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" в настоящем документе определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, чтобы достичь максимального процента идентичности последовательности, не принимая во внимание любые консервативные замены в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах квалификации специалиста в настоящей области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLASTSM, BLASTSM-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR®). Специалисты в настоящей области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая в себя любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по полной длине сравниваемых последовательностей.

Для целей настоящего изобретения % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А к, по отношению к или против, данной аминокислотной последовательности В (что альтернативно может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность, которая характеризуется наличием или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом: 100 умножить на X/Y, где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей, такой как BLASTSM, BLASTSM-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR®), в выравнивании программы А и В, и где Y представляет общее количество аминокислотных остатков в В. Следует принять во внимание, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А.

Используемый в настоящем документе аминокислотный остаток в полипептиде рассматривается как "вносящий свой вклад в связывание" с мишенью, если (1) любой из отличных от водорода атомов боковой цепи или основной цепи остатка обнаруживается в пределах пяти ангстрем любого атома связывающей мишени на основе экспериментально определенной трехмерной структуры комплекса и/или (2) мутация остатка на его эквивалент в $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа (например, SEQ ID NO: 1), на аланин или остаток, характеризующийся аналогичным размером или меньшей боковой цепью, чем рассматриваемый остаток, приводит к измеримому увеличению равновесной константы диссоциации к мишени (например, увеличению k_{on}).

"Период полураспада" в сыворотке или плазме полипептида в общем случае может быть определен как время, необходимое для того, чтобы концентрация полипептида в сыворотке уменьшилась на 50% *in vivo*, например, из-за деградации полипептида и/или выведения, или секвестрации полипептида естественными механизмами. Период полураспада может быть определен любым хорошо известным способом, например путем фармакокинетического анализа. Приемлемые техники будут понятны специалисту в настоящей области техники и могут, например, как правило, включать в себя стадии введения подходящей дозы полипептида примату; сбор образцов крови или других образцов от указанного примата через регулярные промежутки времени; определение содержания или концентрации полипептида в указанном образце крови и вычисление из полученных таким образом данных (построение графика) времени до того момента, когда содержание или концентрация полипептида снизится на 50% по сравнению с исходным содержанием после введения дозы. Способы определения периода полураспада могут быть найдены, например, в Kenneth et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996) и Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics, Second Rev. Edition*, Marcel Dekker (1982).

Период полураспада в сыворотке может быть выражен с использованием таких параметров, как 1/2-альфа, t1/2-бета и площади под кривой (AUC). "Увеличение периода полураспада" относится к увеличе-

нию любого одного из этих параметров, любых двух из этих параметров или всех трех этих параметров. Согласно некоторым вариантам осуществления увеличение периода полураспада относится к увеличению $t_{1/2}$ -бета, как с увеличением $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или и того и другого, так без него.

"Срок годности" фармацевтического продукта, например белка, содержащего фрагмент FBS и фрагмент HSA, представляет собой продолжительность времени, в течение которого продукт хранится до того, как произойдет распад. Например, срок годности может быть определен как время до распада 0,1, 0,5, 1, 5 или 10% продукта.

Обзор.

В настоящем документе предусмотрены белки, содержащие основанный на фибронектине каркасный (FBS) домен, например Fn3, такой как молекулы 10 Fn3, которые специфически связываются с мишенью, и причем домен FBS связан на С-конце с областью, состоящей из PmX_n , где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту и где n равно 0 или представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1. Заявка основана, по меньшей мере, частично, на открытии того факта, что добавление пролина и необязательно одной или нескольких аминокислот на С-конце молекулы 10 Fn3 усиливает по меньшей мере одну характеристику молекулы 10 Fn3, например ее термостабильность или растворимость, по отношению к неизменной молекуле 10 Fn3. Могут быть разработаны описанные в настоящем документе молекулы 10 Fn3 для связывания с любой представляющей интерес мишенью. Согласно иллюстративным вариантам осуществления мишень представляет собой антиген, полипептид или представляющий интерес терапевтический белок-мишень. Иллюстративные терапевтически желательные мишени включают в себя, например, фактор некроза опухолей альфа (TNF-альфа), VEGFR2, PCSK9, IL-23, EGFR и IGF1R.

Основанные на фибронектине каркасы.

Используемый в настоящем документе термин "основанный на фибронектине каркасный" или "FBS" белок или фрагмент относится к белкам или фрагментам, которые основаны на повторе фибронектина типа III ("Fn3"). Fn3 представляет собой небольшой домен (приблизительно 10 кДа), который характеризуется структурой иммуноглобулиновой (Ig) складки (т.е. Ig-подобная структура β -сэндвич, состоящая из семи β -нитей и шести петель). Фибронектин содержит 18 повторов Fn3 и, поскольку гомология последовательностей между повторами низка, все они характеризуются высоким сходством в третичной структуре. Домены Fn3 также присутствуют во многих отличных от фибронектина белках, таких как молекулы адгезии, молекулы клеточной поверхности, например рецепторы цитокинов, и связывающих углеводы доменов. Для обзора см. Bork et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19):8990-8994 (1992); Bork et al., J. Mol. Biol., 242(4):309-320 (1994); Campbell et al., Structure, 2(5):333-337 (1994); Harpez et al., J. Mol. Biol., 238(4):528-539 (1994). Термин белок или фрагмент "FBS" предназначен для включения основанных на доменах Fn3 каркасов из этих других белков (т.е. не являющихся молекулами фибронектина).

Домен Fn3 является небольшим, мономерным, растворимым и стабильным. В нем отсутствуют дисульфидные связи и, следовательно, он стабилен в восстанавливающих условиях. Домены Fn3 содержат по порядку от N-конца к С-концу: бета- или бета-подобные нити, A; петлю, AB; бета- или бета-подобные нити, B; петлю, BC; бета- или бета-подобные нити, C; петлю, CD; бета- или бета-подобные нити, D; петлю, DE; бета-или бета-подобные нити, E; петлю, EF; бета- или бета-подобные нити, F; петлю, FG; и бета-или бета-подобные нити, G. Семь антипараллельных Р-нитей расположены в виде двух бета-листов, которые образуют устойчивое ядро, создавая две "поверхности", состоящие из петель, которые соединяют бета- или бета-подобные нити. Петли AB, CD и EF расположены на одной поверхности ("южный полюс"), а петли BC, DE и FG расположены на противоположной поверхности ("северный полюс").

Петли в молекулах Fn3 структурно аналогичны определяющим комплементарность областям (CDR) антител и при изменении могут быть вовлечены в связывание молекулы Fn3 с мишенью, например белком-мишенью. Другие области молекул Fn3, такие как бета- или бета-подобные нити и N-концевые или С-концевые области при изменении также могут быть вовлечены в связывание с мишенью. Любые или все петли AB, BC, CD, DE, EF и FG могут участвовать в связывании с мишенью. Любая из бета- или бета-подобных нитей может быть вовлечена в связывание с мишенью. Домены Fn3 могут также связываться с мишенью посредством одной или нескольких петель и одной или нескольких бета- или бета-подобных нитей. Связывание может также потребовать N-концевые или С-концевые области. Домен FBS для использования в белке может содержать все петли, все бета- или бета-подобные нити или только часть из них, причем некоторые петли и/или бета- или бета-нити, и/или N- или С-концевые области модифицируются (или изменяются), при условии, что домен FBS предпочтительно специфически связывается с мишенью. Например, домен FBS может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 петель, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 бета-нитей и, необязательно, N-концевую и/или С-концевую область, причем одна или несколько петель, одна или несколько бета-нитей, N-концевая область и/или С-концевые области модифицированы по сравнению с доменом FBS дикого типа.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления описанные в настоящем документе связывающие лиганд (или мишень) фрагменты FBS основываются на десятом домена фибронектина типа III,

т.е. десятом модуле Fn3 ($^{10}\text{Fn3}$). Аминокислотная последовательность человеческого фрагмента $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа выглядит следующим образом:

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT

ISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1)

(петли AB, CD и EF подчеркнуты; петли BC, FG и DE выделены жирным шрифтом, β -нити расположены между или рядом с каждой из областей петли и N-концевая область выделена курсивом). Последние два аминокислотных остатка SEQ ID NO: 1 представляют собой часть C-концевой области.

У человеческих молекул $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа также отсутствует N-концевая область или ее часть. Так, например, молекула $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа может содержать SEQ ID NO: 1, в которой удалены аминокислотные остатки 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 или 1-7 (SEQ ID NOS: 2-8, соответственно). В табл. 1 показана аминокислотная последовательность этих человеческих фрагментов $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности человеческих молекул $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа с различными N-концевыми областями

Версия	N-концевая область	Человеческий домен ядра $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа	Полная длина
1	VSDVPRD (SEQ ID NO : 19)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 1
2	SDVPRD (SEQ ID NO : 20)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 2
3	DVPRD (SEQ ID NO : 21)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 3
4	VPRD (SEQ ID NO : 22)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 4
5	PRD	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 5
6	RD	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 6
7	D	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 7
8	-	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 8

Согласно некоторым вариантам осуществления петля AB соответствует остаткам 14-17, петля BC соответствует остаткам 23-31, петля CD соответствует остаткам 37-47, петля DE соответствует остаткам 51-56, петля EF соответствует остаткам 63-67 и петля FG соответствует остаткам 75-87 из SEQ ID NO: 1. Петли BC, DE и FG выравниваются вдоль одной поверхности молекулы, т.е. "северного полюса", а петли AB, CD и EF выравниваются вдоль противоположной поверхности молекулы, т.е. "южного полюса". В SEQ ID NO: 1 β -нить A соответствует остаткам 8-13, P-нить B соответствует остаткам 18-22, β -нить C

соответствует остаткам 32-36, бета-нить D соответствует остаткам 48-50, β-нить E соответствует остаткам 57-62, β-нить F соответствует остаткам 68-74 и β-нить G соответствует остаткам 88-92. β-нити соединены друг с другом через соответствующую петлю, например нити A и B соединены посредством петли AB при образовании β-нити A, петли AB, β-нити B и т.д.

Примерами белков FBS, которые основаны на доменах ¹⁰Fn3 человека, являются аднектины (Adnexin, дочерняя компания Bristol-Myers Squibb). Аднектины представляют собой молекулы ¹⁰Fn3, в которых CDR-подобные области петель, бета-нити, N-концевые и/или C-концевые области домена ¹⁰Fn3 были модифицированы таким образом, чтобы сделать белок способным связываться с представляющим интерес соединением. Например, в патенте США № 7115396 описаны белки домена ¹⁰Fn3, в которых изменения в петлях BC, DE и FG приводят к высокой аффинности связывающего TNFα соединения. В патенте США № 7858739 описаны белки домена Fn3, в которых изменения в петлях BC, DE и FG приводят к высокой аффинности связывающего VEGFR2 соединения.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS содержит домен ¹⁰Fn3, который определяется, как правило, посредством следующей вырожденной последовательности:

VSDVPRDLEVVA(X)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zISIN

YRT (SEQ ID NO: 9),

или посредством последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 10-16, последовательности в которой идентичны последовательности SEQ ID NO: 9, за исключением того, что у них отсутствуют 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 N-концевых аминокислот, соответственно. В табл. 2 показаны аминокислотные последовательности этих вырожденных молекул ¹⁰Fn3 человека.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности вырожденных молекул ¹⁰Fn3 дикого типа человека с различными N-концевыми областями

Версия	N-концевая область	Человеческий домен ядра ¹⁰ Fn3 дикого типа	Полная длина
1	VSDVPRD (SEQ ID NO : 19)	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 9
2	SDVPRD (SEQ ID NO : 20)	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 10
3	DVPRD (SEQ ID NO : 21)	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11
4	VPRD (SEQ ID NO : 22)	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 12
5	PRD	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 13
6	RD	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 14
7	D	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 15
8	-	LEVVA(X) _u LLISW(X) _v YRITY(X) _w FTV(X) _x ATISGL(X) _y YTITVYA(X) _z ISIN (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 16

В SEQ ID NO: 25-32 и 50 петля AB представлена посредством (X)_u, петля BC представлена посредством (X)_v, петля CD представлена посредством (X)_w, петля DE представлена посредством (X)_x, петля EF представлена посредством (X)_y и петля FG представлена посредством X_z. X представляет собой любую аминокислоту, а нижний индекс после X представляет собой целое число количества аминокислот. В частности, u, v, w, x, y и z может каждый независимо друг от друга представлять собой от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 8, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 5 до 8, от 6 до 20, от 6 до 15, от 6 до 10, от 6

до 8, от 2 до 7, от 5 до 7 или от 6 до 7 аминокислот. Последовательности бета-нитей (подчеркнутые в SEQ ID NO: 9) могут содержать от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замены, делеции или добавления во всех 7 областях каркасов относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 9-16. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности бета-нитей могут содержать от 0 до 10, от 0 до 8, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2 или от 0 до 1 замены, например консервативной замены, во всех 7 областях каркасов относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 9-16.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные остатки гидрофобного ядра (выделенные жирным шрифтом аминокислотные остатки в последовательности SEQ ID NO: 9 выше) фиксированы и любые замены, консервативные замены, делеции или добавления происходят в отличных от гидрофобного ядра аминокислотных остатках. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления остатки гидрофобного ядра полипептидов, предусмотренных в настоящем документе, не были модифицированы по сравнению с человеческим доменом $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа (например, SEQ ID NO: 1).

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS содержит домен $^{10}\text{Fn3}$, причем домен $^{10}\text{Fn3}$ содержит петлю AB; петлю BC; петлю CD; петлю DE; петлю EF; и петлю FG; и содержит по меньшей мере одну петлю, выбранную из петель AB, BC, CD, DE, EF и FG с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли человеческого домена Fn3 дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления изменена единственная петля. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены не более чем 2 петли. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены не более чем 3 петли. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены петли BC, DE и/или FG. Согласно некоторым вариантам осуществления изменены петли AB, CD и EF. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG представляет собой единственную петлю, которая изменена. Согласно некоторым вариантам осуществления петля CD представляет собой единственную петлю, которая изменена. Согласно другим вариантам осуществления обе петли CD и FG изменены, а, необязательно, другие петли не изменяются. Согласно некоторым вариантам осуществления обе петли CD и EF изменены, а, необязательно, другие петли не изменяются. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько конкретных изменений каркасов сочетается с одним или несколькими изменениями петли. Под термином "изменен" подразумевается одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по отношению к последовательности шаблона (т.е. соответствующего человеческого домена фибронектина дикого типа) и включает в себя аминокислотные добавки, делеции и замены. Иллюстративные молекулы $^{10}\text{Fn3}$, содержащие специфические комбинации измененных петель и/или областей каркасов (например, бета-цепи, N-концевая область и C-концевая область), дополнительно раскрыты в настоящем документе.

Следует понимать, что не каждый остаток в пределах области петли нуждается в модификации для того, чтобы связывающий домен $^{10}\text{Fn3}$ достиг сильной аффинности к требуемой мишени. Кроме того, также могут быть сделаны вставки и делеции в областях петли, при этом все еще вызывая высокую аффинность связывающих доменов $^{10}\text{Fn3}$.

Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько петель, выбранных из AB, BC, CD, DE, EF и FG, могут быть увеличены или сокращены по длине по отношению к соответствующей петле в человеческом $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа. В любом данном полипептиде одна или несколько петель могут быть увеличены в длину, одна или несколько петель могут быть уменьшены в длину или могут происходить их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления длина данной петли может быть увеличена на 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20 или 10-15 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления длина данной петли может быть уменьшена на 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 или 2-5 аминокислот. В частности, петля FG $^{10}\text{Fn3}$ составляет в длину 13 остатков, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител варьирует в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для оптимизации связывания антигена в полипептидах, использующих FG для связывания мишени, таким образом, длина петли FG $^{10}\text{Fn3}$ может изменяться по длине, а также по последовательности, чтобы получить максимально возможную гибкость и аффинность при связывании с мишенью.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS содержит домен $^{10}\text{Fn3}$, в котором непетлевые области содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентична непетлевым областям последовательности SEQ ID NO: 1, причем по меньшей мере одна петля, выбранная из AB, BC, CD, DE, EF и FG, изменена. Например, согласно некоторым вариантам осуществления петля AB может содержать до 4 замен аминокислот, до 10 вставок аминокислот, до 3 делеций аминокислот или их сочетание; петля BC может содержать до 10 замен аминокислот, до 4 делеций аминокислот, до 10 вставок аминокислот или их сочетание; петля CD может содержать до 6 замен аминокислот, до 10 вставок аминокислот, до 4 делеций аминокислот или их сочетание; петля DE может содержать до 6 замен аминокислот, до 4 делеций аминокислот, до 13 вставок аминокислот или их сочетание; петля EF может содержать до 5 замен аминокислот, до 10 вставок аминокислот, до 3 делеций аминокислот или их сочетание; и/или петля FG может содержать до 12 замен аминокислот, до 11 делеций аминокислот, до 25 вставок аминокислот или их сочетание.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS содержит домен $^{10}\text{Fn3}$, характери-

зующийся идентичностью по меньшей мере 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% по отношению к домену $^{10}\text{Fn3}$ человека, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, содержащих SEQ ID NO: 1-16. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный в настоящем документе фрагмент FBS характеризуется идентичностью по меньшей мере 50% по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из группы аминокислотных последовательностей, содержащих SEQ ID NO: 1-16. Согласно другим вариантам осуществления фрагмент FBS характеризуется идентичностью по меньшей мере 65% по отношению к аминокислотной последовательности, выбранной из группы аминокислотных последовательностей, содержащих SEQ ID NO: 1-16. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько петель не будут модифицированы по отношению к последовательности соответствующей петли последовательности дикого типа, и/или одна или несколько из β -нитей не будут модифицированы по отношению к последовательности соответствующей β -нити последовательности дикого типа, и/или N-концевые или C-концевые области не будут модифицированы. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из бета- или бета-подобных нитей домена $^{10}\text{Fn3}$ в фрагменте FBS может содержать, по существу состоять из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности соответствующей бета- или бета-подобной цепи SEQ ID NO: 1. Предпочтительно вариации в областях β -нитей не будут нарушать стабильность полипептида в физиологических условиях.

Согласно некоторым вариантам осуществления непетлевая область домена $^{10}\text{Fn3}$ может быть модифицирована посредством одной или нескольких консервативных замен. Вплоть до 5, 10, 20 или даже 30% или более аминокислот в домене $^{10}\text{Fn3}$ могут быть изменены посредством консервативной замены без существенного изменения аффинности $^{10}\text{Fn3}$ к лиганду. Согласно некоторым вариантам осуществления непетлевые области, например Р-нити, могут содержать в любом месте в пределах 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 1-15, 1-10, 1-8, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-15, 2-10, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 5-15 или 5-10 консервативных аминокислотных замен. Согласно иллюстративным вариантам осуществления модификация каркаса может снижать аффинность связывания $^{10}\text{Fn3}$ с лигандом менее чем в 100 раз, 50 раз, 25 раз, 10 раз, в 5 раз или в 2 раза. Возможно, что такие изменения могут изменять иммуногенность $^{10}\text{Fn3}$ *in vivo*, и там, где иммуногенность уменьшается, такие изменения могут быть желательны. Используемые в настоящем документе "консервативные замены" представляют собой остатки, которые физически или функционально аналогичны соответствующим эталонным остаткам. То есть консервативная замена и ее эталонный остаток имеют сходный размер, форму, электрический заряд, химические свойства, включая в себя способность образовывать ковалентные или водородные связи или т.п. Иллюстративные консервативные замены включают в себя те, которые отвечают критериям, определенным для принятой точечной мутации в Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 (1978 and Supp.). Примеры консервативных замен включают в себя замены в пределах следующих групп: (a) валин, глицин; (b) глицин, аланин; (c) валин, изолейцин, лейцин; (d) аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; (e) аспарагин, глутамин; (f) серии, треонин; (g) лизин, аргинин, метионин и (h) фенилаланин, тирозин.

Кроме того в настоящем документе предусмотрены домены $^{10}\text{Fn3}$, содержащие комбинации модификаций петель и каркасов. Конъюгаты могут содержать домен $^{10}\text{Fn3}$, содержащий (I) модификацию в аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из петель АВ, ВС, CD, DE, EF или FG и (II) модификацию в аминокислотной последовательности по меньшей мере одной каркасной области (т.е. модификацию по меньшей мере одной β -нити, N-концевой области и/или C-концевой области), причем модифицированная петля(и) и модифицированная область(и) обе способствуют связыванию с одной и той же мишенью. Согласно иллюстративным вариантам осуществления модификации каркасной области расположены рядом с модификациями в области петли, например если петля АВ модифицируется, мутации каркаса могут, как правило, находиться в β -нити А и/или β -нити В, которые примыкают к петле АВ в линейной последовательности домена $^{10}\text{Fn3}$. Согласно другим вариантам осуществления кластер модификаций может быть обнаружен совместно в петлевых и каркасных областях, которые соседствуют друг с другом в линейной последовательности домена Fn3 . Например, участки связывания Fn3 , содержащие модификации как петли, так и каркаса, могут содержать кластеры модификаций аминокислот в следующих комбинациях областей петли и каркаса, которые соседствуют друг с другом в линейной последовательности домена Fn3 : β -нить/петля/ β -нить, петля/ β -нить/петля, петля/ β -нить/петля/ β -нить, концевая область/ β -нить/петля или петля/ β -нить/концевая область и т.д. Например, домены Fn3 , содержащие новые комбинации модификаций петли и каркаса, могут содержать такие кластеры модификаций, что на участке из 20 смежных аминокислот по меньшей мере 15 аминокислот модифицированы по сравнению с диким типом. Согласно другим вариантам осуществления по меньшей мере 17 из 20, 18 из 20, 17 из 25, 20 из 25 или 25 из 30 остатков в смежном участке представляют собой модифицированные по сравнению с последовательностью домена Fn3 дикого типа на соответствующем участке аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления данный домен Fn3 может содержать два или три кластера модификаций, разделенных участками немодифицированной (т.е. дикого типа) последовательности. Для любой данной области (т.е. петли, β -нити или концевой области), которая модифицирована, вся или только часть области может быть модифицирована по отношению к последовательности дикого типа. Когда

область β -нити модифицируется, предпочтительно остатки гидрофобного ядра остаются немодифицированными (т.е. дикого типа), а один или несколько остатков неядра в β -нити модифицируется.

Согласно некоторым вариантам осуществления домены $^{10}\text{Fn3}$ содержат связывающую поверхность вдоль "западной стороны" молекулы ("участки связывания западной стороны" или "участки связывания WS"). Участки связывания WS могут содержать модифицированную петлю CD и модифицированную петлю FG, по сравнению с соответствующими последовательностями петель CD и FG, представленными в SEQ ID NO: 1. Обе петли CD и FG вносят свой вклад в связывание с той же самой мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления участки связывания WS могут содержать дополнительные модификации в одной или нескольких областях в пределах домена Fn3. Например, участки связывания WS могут содержать модификации каркасов в одной или нескольких областях β -нити, смежных с петлями CD и/или FG. В частности, участки связывания WS могут содержать модификации последовательности в одной или нескольких из β -нити C, β -нити D, β -нити F и/или β -нити G. Иллюстративные модификации каркасов включают в себя модификации в одном или нескольких положениях каркасной области, соответствующей положениям аминокислот: 33, 35, 49, 69, 71, 73, 89 и/или 91 в SEQ ID NO: 1. Участки связывания WS могут также содержать модификации в петле BC, в частности, в C-концевой части петли BC. Согласно одному варианту осуществления два последних остатка петли BC (т.е. соответствующие аминокислотам 30 и 31 в домене $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа) модифицируются по сравнению с последовательностью дикого типа. Все или часть дополнительных модификаций петли и каркаса могут способствовать связыванию с мишенью в сочетании с модифицированными петлями CD и FG. Предпочтительно гидрофобные остатки ядра не модифицируются по сравнению с последовательностью дикого типа.

Иллюстративные участки связывания WS включают в себя те, которые содержат аминокислоту дикого типа или мутантную в положениях 30, 31, 33, 35, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 84, 85, 86, 87, 89 или 91.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен $^{10}\text{Fn3}$ содержит модификации в петлях CD, DE и, в некоторых случаях, EF, причем модификации петли вносят свой вклад в связывание с мишенью. Эти полипептиды называются "фронтальными участками связывания". Фронтальные участки связывания могут дополнительно содержать модификации в одной или нескольких областях каркаса, в частности, в областях каркаса, которые фланкируют или примыкают к области модифицированной петли. Например, фронтальные участки связывания могут содержать модификацию каркасов в одной или нескольких из β -нити C, β -нити D и/или β -нити E по отношению к последовательностям соответствующих β -нитей домена Fn3 дикого типа, например человеческого домена $^{10}\text{Fn3}$ (SEQ ID NO: 1). Предпочтительно остатки гидрофобного ядра не изменяются, по сравнению с последовательностью дикого типа. Иллюстративные модификации каркаса, которые могут присутствовать во фронтальных участках связывания, включают в себя модификации в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям аминокислот 36, 49, 58 и/или 50 в SEQ ID NO: 1. Такие модификации каркаса могут способствовать связыванию с мишенью вместе с модифицированными петлями. Согласно некоторым вариантам осуществления фронтальные участки связывания могут содержать кластеры модификаций, охватывающие несколько областей петель и нитей Fn3, например домена $^{10}\text{Fn3}$. В частности, фронтальные участки связывания могут содержать модификации по меньшей мере в 15, 20, 24, 25 или 27 из 31 остатков между аминокислотами, соответствующими остаткам с 36 по 66 Fn3 дикого типа, например человеческого домена $^{10}\text{Fn3}$ (SEQ ID NO: 1). Модификации петель и/или нитей могут включать в себя аминокислотные замены, делеции и/или вставки или их комбинации. Согласно иллюстративным вариантам осуществления петля CD вытянута в длину или уменьшена в длину по отношению к петле CD в Fn3, например, человеческом домене $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Согласно некоторым вариантам осуществления домены $^{10}\text{Fn3}$ содержат модификации в петлях EF и FG, причем модификации петель способствуют связыванию с той же мишенью. Эти полипептиды упоминаются в настоящем документе как "задние участки связывания". Задние участки связывания могут содержать дополнительные модификации в других областях петель и/или каркасов. Например, задний участок связывания может содержать модификации по меньшей мере в части петли AB, предпочтительно N-концевой части петли AB. Согласно иллюстративному варианту осуществления первые две аминокислоты петли AB (т.е. соответствующие аминокислотным остаткам 14 и 15 домена $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа) модифицируются по сравнению с последовательностью дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления задний участок связывания может также содержать одну или несколько модификаций каркасов, в частности, модификации в одной или нескольких областях каркасов, которые примыкают к модифицированной области петли. Например, задние участки связывания могут содержать одну или несколько модификаций в одной или нескольких из β -нити A, β -нити G, N-концевой области и/или C-концевой области. Предпочтительно, чтобы остатки гидрофобного ядра не модифицировались по сравнению с последовательностью дикого типа. Иллюстративные модификации каркаса включают в себя модификации в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям аминокислот 1-7, 9-13, 89, 91, 93 и/или 94 в SEQ ID NO: 1. Одна или несколько дополнительных модификаций петель и/или каркасов могут внести свой вклад в связывание с мишенью вместе с модифицированными петлями

EF и FG. Подходящие модификации областей петель и/или каркасов включают в себя аминокислотные замены, делеции и/или вставки или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность петли FG увеличивается в длину или уменьшается в длину относительно петли FG человеческого домена ¹⁰Fn3 дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Согласно некоторым вариантам осуществления задний участок связывания может содержать кластер модифицированных аминокислотных остатков на непрерывном участке нескольких областей в домене ¹⁰Fn3. Например, по меньшей мере 14 из первых 15 аминокислотных остатков Fn3, например домена ¹⁰Fn3, могут быть модифицированы по сравнению с соответствующими остатками в Fn3 дикого типа, например человеческого домена ¹⁰Fn3 (SEQ ID NO: 1), и/или по меньшей мере 15 из 18 остатков между аминокислотами, соответствующими остаткам с 80 по 97 (или 94) Fn3 дикого типа, например человеческого домена ¹⁰Fn3 (SEQ ID NO: 1 или 23), могут быть модифицированы относительно соответствующих остатков в последовательности дикого типа. При упоминании аминокислот в положениях далее С-концевых до 94 в молекуле ¹⁰Fn3, это касается молекулы ¹⁰Fn3, которая содержит гибкий линкер между 10-м и 11-м повтором домена Fn3, т.е. EIDKPSQ, образуя, таким образом, белок длиной в 101 аминокислоту (таким образом, SEQ ID NO: 1, связанная с EIDKPSQ на С-конце, представлена SEQ ID NO: 23).

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFVPGS

KSTATISGLKPGVDYTTVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT EIDKPSQ (SEQ ID NO: 23)

Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fn3 содержит модификации в аминокислотных последовательностях β-нити А, петли АВ, β-нити В, петли CD, β-нити Е, петли EF и β-нити F, по отношению к последовательностям соответствующих областей последовательности дикого типа. Эти полипептиды в настоящем документе называются "участки связывания южного полюса" или "участки связывания SP". Модифицированные петли и нити способствуют связыванию с той же самой мишенью. Аминокислотная последовательность петли CD может быть вытянута в длину или уменьшена в длину относительно петли CD Fn3 дикого типа, например человеческого домена ¹⁰Fn3 (SEQ ID NO: 1 или 23). Участки связывания южного полюса могут содержать дополнительные модификации в β-нити G и/или С-концевой области относительно последовательности, соответствующей области последовательности дикого типа. Согласно иллюстративным вариантам осуществления участки связывания южного полюса могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот, соответствующих положениям 11, 12, 19, 60, 61, 69, 91, 93 и 95-97 последовательности дикого типа.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен ¹⁰Fn3 содержит модифицированные петли BC, DE и FG, по сравнению с соответствующими последовательностями петель BC, DE и FG, представленными в SEQ ID NO: 1 или 23, а также дополнительные модификации в одном или нескольких остатках нитей из β-нити С, β-нити D, β-нити F и β-нити G. Модификации областей β-нитей и петель вместе способствуют связыванию с мишенью. Эти белки называют в настоящем документе также "северо-западными участками связывания" или "NW участками связывания". Согласно иллюстративным вариантам осуществления NW участки связывания содержат одну или несколько модификаций каркасов в любом из аминокислотных положений или их комбинации, соответствующих положениям каркасной области R33, T49, Y73 и S89 из SEQ ID NO: 1 или 23. Соответствующие модификации в областях петли и каркаса включают в себя аминокислотные замены, делеции и/или вставки или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько из петель BC, DE и FG вытянуты в длину или уменьшены в длину или присутствует их комбинация, по отношению к последовательности дикого типа. Согласно одному варианту осуществления каждая из петель BC, DE и FG вытянута в длину или уменьшена в длину или присутствует их комбинация, по отношению к последовательности дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или 23). Согласно некоторым вариантам осуществления только часть петли BC модифицируется, в частности С-концевая часть, по отношению к последовательности дикого типа. Например, петля BC может быть модифицирована только в аминокислотных остатках, соответствующих аминокислотам 27-31 петли BC дикого типа, в то время как остальная часть петли BC (т.е. соответствующая остаткам 23-26 петли дикого типа) остается без изменений.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен ¹⁰Fn3 содержит модифицированную петлю BC, DE и FG, а также одну или несколько дополнительных модификаций в любом из N-концевой области, β-нити А, β-нити В и/или β-нити Е или их комбинации. Эти белки называют также в настоящем документе "северо-восточными участками связывания" или "NE участками связывания". Согласно иллюстративным вариантам осуществления NE участки связывания модифицируются в любой из аминокислот или их комбинации, соответствующих положениям области каркаса 1-7, E9, L19, S21 и/или T58 последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1 или 23). Сочетание модифицированных областей петли и каркаса способствует связыванию с мишенью.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен ¹⁰Fn3 содержит модификации в одной или нескольких из петель АВ, CD, DE и EF, а также дополнительные модификации в одной или нескольких из β-нити В, β-нити D и/или β-нити Е. Эти белки в настоящем документе называют также "участки связывания южного фронта". Сочетание модифицированных остатков петель и нитей способствует связыванию с мишенью. Согласно иллюстративным вариантам осуществления участок связывания южного

фронта может быть модифицирован в одном или нескольких аминокислотных положениях, соответствующих положениям области каркаса L19, T49, T58, S60 и/или G61 в SEQ ID NO: 1 или 23, и/или в одном или нескольких положениях аминокислот, соответствующих положениям области петли T14-S17, P51, T56, G40-E47 и/или K63-G65 в SEQ ID NO: 1 или 23. Согласно иллюстративным вариантам осуществления участок связывания южного фронта может быть вытянут в длину или уменьшен в длину в петле АВ между аминокислотами, соответствующими остатками 18 и 20 последовательности дикого типа и/или в петле CD.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен $^{10}\text{Fn3}$ содержит модифицированную β -нить А и β -нить G, по сравнению с соответствующей нитью SEQ ID NO: 1 или 23. Эти белки в настоящем документе называют также "участки связывания AG" или участки связывания "нити AG". Согласно некоторым вариантам осуществления участки связывания нити AG содержат кластеры модификаций на N-концевых и C-концевых частях Fn3, например домена $^{10}\text{Fn3}$, в то время как средняя часть Fn3 остается неизменной. Например, участок связывания нити AG может содержать модификации в 16 из первых 19 аминокислот в домене $^{10}\text{Fn3}$ (т.е. соответствующих положениям аминокислот 1-19 SEQ ID NO: 1 или 23) и модификации в 13-17 из последних 18 аминокислот в домене $^{10}\text{Fn3}$ (т.е. соответствующих положениям аминокислот 84-101 последовательности SEQ ID NO: 9), или в 14-18 из последних 22 аминокислот в домене $^{10}\text{Fn3}$ (т.е. соответствующих положениям аминокислот 80-101 последовательности SEQ ID NO: 9). Согласно иллюстративным вариантам осуществления участок связывания AG может содержать модификации в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 1-7, 9, 11-17, 19, 84-89 и 91-97 в SEQ ID NO: 9. Предпочтительно модифицированные области в участке связывания AG способствуют связыванию с той же самой мишенью.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен $^{10}\text{Fn3}$ содержит модифицированную петлю CD и EF, а также дополнительные модификации в любом из или комбинации остатков, соответствующих положениям 69 или 91-97 в SEQ ID NO: 1 или 23. Эти белки в настоящем документе называются как "юго-западные участки связывания" или "SW участки связывания". Модифицированные области петли и каркаса способствуют связыванию с мишенью.

Согласно некоторым вариантам осуществления белки содержат домен $^{10}\text{Fn3}$, характеризующийся сниженной иммуногенностью, причем часть петли BC остается в виде петли дикого типа. Предпочтительно такие полипептиды характеризуются низкой иммуногенностью по отношению к эквивалентному полипептиду с модификациями в большей части петли BC. Согласно иллюстративным вариантам осуществления N-концевая часть петли BC остается в виде петли дикого типа. Например, первые 1, 2, 3, 4, 5, или 5 остатков петли BC могут оставаться такими же, как у дикого типа, в то время как остальные C-концевые остатки петли BC могут быть модифицированы. В дизайнах Fn3, содержащих по меньшей мере часть N-концевой области петли BC, как у дикого типа, может быть желательно оставить все или часть β -нити В и/или β -нити С немодифицированными по отношению к последовательности дикого типа, а также, в частности, части β -нити В и/или β -нити С, которые являются смежными с петлей BC (т.е. C-концевая часть β -нити В и/или N-концевая часть β -нити С). Согласно иллюстративным вариантам осуществления домены Fn3, содержащие последовательность дикого типа в N-концевой части петли BC и характеризующиеся сниженной иммуногенностью, не могут содержать каких-либо модификаций в N-концевой области, β -нити А, петли АВ и β -нити В. В дизайнах Fn3 с частью петли BC как в последовательности дикого типа, модифицированная часть петли BC может внести свой вклад в связывание мишени наряду с модификациями в других областях домена $^{10}\text{Fn3}$.

Согласно некоторым вариантам осуществления белки содержат домен $^{10}\text{Fn3}$, характеризующийся пониженной иммуногенностью, в котором сильный якорь HLA в области β -нити В/петли BC/ β -нити С (далее "якорь BC") был удален или уничтожен (например, модифицирован по отношению к последовательности дикого типа таким образом, который снижает аффинность связывания с одним или несколькими рецепторами HLA). Например, якорь BC может быть удален или уничтожен путем модификации домена Fn3, например $^{10}\text{Fn3}$, в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям L19, S21, R33 и/или T35 SEQ ID NO: 1. Когда якорь BC был удален или разрушен, можно модифицировать последовательность петли BC без существенного увеличения иммуногенного потенциала области BC. Соответственно, многие из таких дизайнов Fn3 содержат модификации в петле BC в дополнение к модификациям в β -нити В и/или β -нити С. Петля BC может внести свой вклад в связывание с мишенью, возможно, в сочетании с модификациями в других областях домена Fn3. Модификации в β -нити В и/или β -нити С могут вносить или не вносить свой вклад в связывание с мишенью.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления FBS, например домен $^{10}\text{Fn3}$, связывается с желаемой мишенью с K_d менее чем 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления FBS, например домен $^{10}\text{Fn3}$, связывается с желаемой мишенью с K_d от 1 пМ до 1 мкМ, от 100 мкМ до 500 нМ, от 1 до 500 нМ или от 1 до 100 нМ. Согласно иллюстративным вариантам осуществления фрагмент $^{10}\text{Fn3}$ специфически связывается с мишенью, с которой не связывается домен $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа, в частности человеческий домен $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа, содержащий, например, SEQ ID NO: 1-8.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO: 1-16, и FBS специфически связывается с мишенью, например с K_d менее чем 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ или менее. Фрагмент FBS может содержать аминокислотные замены (или изменения) в одной или нескольких петлях и в одной или нескольких областях каркаса.

Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько остатков связывающего интегрин мотива "аргинин-глицин-аспарагиновая кислота" (RGD) (аминокислоты 78-80 SEQ ID NO: 1) могут быть заменены таким образом, чтобы нарушить связывание интегрина. Согласно некоторым вариантам осуществления петля FG предусмотренных в настоящем документе полипептидов не содержит сайт связывания интегрин RGD. Согласно одному варианту осуществления последовательность RGD заменяется последовательностью "полярная аминокислота-нейтральная аминокислота-кислая аминокислота" (в направлении от N-конца к C-концу). Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность RGD заменяется SGE или RGE.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотные последовательности N-концевых и/или C-концевых областей фрагмента FBS модифицируют путем делеции, замены или вставки по отношению к аминокислотным последовательностям соответствующих областей доменов $^{10}\text{Fn3}$, содержащих, например, SEQ ID NO: 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность первых 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков SEQ ID NO: 1 может быть модифицирована или удалена в предусмотренных в настоящем документе полипептидах относительно последовательности соответствующих аминокислот в человеческом домене $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа, содержащего SEQ ID NO: 1. Согласно иллюстративным вариантам осуществления аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-7, 8 или 9 из любой из SEQ ID NO: 1-16, замещаются альтернативной N-концевой областью, содержащей 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислоту в длину. Иллюстративные альтернативные N-концевые области включают в себя (представлены однобуквенным кодом аминокислоты) M, MG, G, MGVS DVPRDL (SEQ ID NO: 24) и GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 25) или N-концевые усечения любой из SEQ ID NO: 24 или 25. Другие подходящие альтернативные N-концевые области включают в себя, например, $X_n\text{SDVPRDL}$ (SEQ ID NO: 26), $X_n\text{DVPRDL}$ (SEQ ID NO: 27), $X_n\text{VPRDL}$ (SEQ ID NO: 28), $X_n\text{PRDL}$ (SEQ ID NO: 29), $X_n\text{RDL}$ (SEQ ID NO: 30), $X_n\text{DL}$ (SEQ ID NO: 31) или $X_n\text{L}$, где $n=0, 1$ или 2 аминокислоты, причем когда $n=1$, X представляет собой Met или Gly и когда $n=2$, X представляет собой Met-Gly. Когда последовательность Met-Gly добавляют к N-концу домена $^{10}\text{Fn3}$, M будет, как правило, отщепляться, оставляя G на N-конце. Согласно другим вариантам осуществления альтернативная N-концевая область содержит аминокислотную последовательность MASTSG (SEQ ID NO: 32).

Как дополнительно описано в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления первые семь или восемь остатков (т.е. остатки 1-7 или 1-8) SEQ ID NO: 1 удаляются, создавая домен $^{10}\text{Fn3}$, содержащий такую аминокислотную последовательность, например как последовательность SEQ ID NO: 8. Дополнительные последовательности могут также быть добавлены к N- или C-концу домена $^{10}\text{Fn3}$, характеризующегося аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 1-16. Например, согласно некоторым вариантам осуществления N-концевое удлинение состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: M, MG и G. Например, любая из SEQ ID NO: 1-16 может предшествовать M, MG и G.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS основан на повторе Fn3, отличном от 10-го повтора домена типа III фибронектина, например фибронектина человека. Например, фрагмент FBS может быть сходным с любым из других повторов фибронектина типа III, например 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м, 8-м, 9-м, 11-м, 12-м, 13-м, 14-м, 15-м, 16-м, 17-м и 18-м повторами Fn3. Согласно еще другим вариантам осуществления фрагмент FBS может происходить от молекулы, отличной от фибронектина. Иллюстративные фрагменты FBS могут быть получены из тенасцина, белка, который состоит из 15 доменов Fn3 с аналогичными сходствами последовательностей друг с другом, как обнаружено в фибронектине. Эти повторы описаны, например, в Jacobs et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25:107 (2012). На основании гомологии повторов в молекуле фибронектина и в молекуле тенасцина, были созданы искусственные молекулы, основанные на этих гомологиях. Белки, содержащие консенсусную аминокислотную последовательность, основанную на гомологии доменов в молекуле фибронектина, называются Fibcon и FibconB (WO 2010/093627 и Jacobs et al. (2012), см. выше), а те, которые основаны на гомологии доменов в молекуле тенасцина, называются Tencon. Иллюстративная аминокислотная последовательность Fibcon содержит следующую аминокислотную последовательность:

MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGS DGRVKEFTVPPSVSSATITG

LKPGTEYTSVIALKDNQSEPLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 33),

причем петля AB состоит из аминокислот 13-16 (TPSS; SEQ ID NO: 34), петля BC состоит из аминокислот 22-28 (TPPRVQI; SEQ ID NO: 35), петля CD состоит из аминокислот 38-43 (VGS DGR SEQ ID NO: 36), петля DE состоит из аминокислот 51-54 (PSVS; SEQ ID NO: 37), петля EF состоит из аминокис-

лот 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 38) и петля FG состоит из аминокислот 75-81 (KDNQSESE; SEQ ID NO: 39). Другая аминокислотная последовательность Fibcon содержит следующую аминокислотную последовательность:

LDAPTDLQVTNVTDTSTVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGPKELTVPPSSTSVTITGI
TPGVEYVVSVYALKDNQESPLVGTCTT (SEQ ID NO: 40;

Jacobs et al., см. выше).

Полученные из тенасина белки Fn3 включают в себя Tencon (WO 2010/051274, WO 2010/051310 и WO 2011/137319, которые специально включены в настоящий документ посредством ссылки). Иллюстративный белок Tencon имеет следующую аминокислотную последовательность:

LPAPKLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAINLTVPGSERSYDL
TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 41;

Jacobs et al., см. выше, и WO2011/137319), причем петля AB состоит из аминокислот 13-16 (TEDS; SEQ ID NO: 42), петля BC состоит из аминокислот 22-28 (TAPDAAF; SEQ ID NO: 43), петля CD состоит из аминокислот 38-43 (SEKVGGE; SEQ ID NO: 44), петля DE состоит из аминокислот 51-54 (GSER; SEQ ID NO: 45), петля EF состоит из аминокислот 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 46) и петля FG состоит из аминокислот 75-81 (KGGHRSN; SEQ ID NO: 47).

Фрагмент Fibcon, FibconB или Tencon или связывающиеся с мишенью их варианты, как сами по себе, так и связанные с гетерологичным фрагментом, могут быть слиты, как описано в настоящем документе. Домены Fn3 от других белков, например гормона клеточной поверхности и цитокиновых рецепторов, шаперонинов и связывающих углеводы доменов, могут быть конъюгированы, как описано в настоящем документе.

Белки или фрагменты FBS описаны, например, в WO 2010/093627, WO 2011/130324, WO 2009/083804, WO 2009/133208, WO 02/04523, WO 2012/016245, WO 2009/023184, WO 2010/051310, WO 2011/020033, WO 2011/051333, WO 2011/051466, WO 2011/092233, WO 2011/100700, WO 2011/130324, WO 2011/130328, WO 2011/137319, WO 2010/051274, WO 2009/086116, WO 09/058379, WO 2013/067029, WO 2012/016245, WO 2014/120891 и WO 2014/043344 (все из которых специально включены в настоящий документ посредством ссылки): любой из описанных в этих публикациях белков или фрагментов FBS может быть использован, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит по меньшей мере 2 фрагмента FBS, например белок содержит поливалентный фрагмент FBS. Например, поливалентный FBS может содержать 2, 3 или более фрагментов FBS, например домены $^{10}\text{Fn3}$, которые ковалентно связаны. Согласно иллюстративным вариантам осуществления фрагмент FBS представляет собой биспецифический или димерный белок, состоящий из двух доменов $^{10}\text{Fn3}$.

Фрагменты FBS, например домены $^{10}\text{Fn3}$, в поливалентном белке могут быть соединены с помощью полипептидного мостика. Иллюстративные полипептидные линкеры включают в себя полипептиды, содержащие 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, или 1-2 аминокислоты. Подходящие линкеры для присоединения доменов $^{10}\text{Fn3}$ представляют собой те, которые позволяют отдельным доменам складываться независимо друг от друга, образуя трехмерную структуру, которая делает возможной высокую аффинность связывания с молекулой-мишенью. Конкретные примеры подходящих линкеров включают в себя линкеры на основе глицина-серина, линкеры на основе глицина-пролина, линкеры на основе пролина-аланина, а также любые другие линкеры, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-пролина. Эти линкеры содержат остатки глицина и пролина и могут быть в пределах от 3 до 30, от 10 до 30, а также от 3 до 20 аминокислот в длину. Примеры таких линкеров включают в себя GPG, GP GPGPG (SEQ ID NO: 48) и GP GPGPGPG (SEQ ID NO: 49). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе пролина-аланина. Эти линкеры содержат остатки пролина и аланина и могут быть в пределах от 3 до 30, от 10 до 30, от 3 до 20 и от 6 до 18 аминокислот в длину. Примеры таких линкеров включают в себя PAPAPA (SEQ ID NO: 50), PAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 51) и PAPAPAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 52). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. Эти линкеры содержат остатки глицина и серина и могут составлять от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот в длину. Примеры таких линкеров включают в себя GSGSGSGSGS ((GS)₅; SEQ ID NO: 53), GSGSGSGSGSGS ((GS)₆; SEQ ID NO: 54), GSGSGSGSGSGSGSGSGS ((GS)₁₀; SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS ((G₄S)₄; SEQ ID NO: 56), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((G₄S)₅; SEQ ID NO: 57) и GGGGSGGGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 58). Согласно иллюстративным вариантам осуществления линкер не содержит пары Asp-Lys (DK).

Фрагменты PmX_n, например стабилизирующие фрагменты.

Согласно некоторым вариантам осуществления FBS, например фрагмент $^{10}\text{Fn3}$, связан на С-конце с остатком, состоящим из PmX_n, где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту, m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и n равно 0 или представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и P находится на N-конце по отношению к X. Фрагмент PmX_n может быть присоединен непосредственно к С-концевой аминокислоте фрагмента $^{10}\text{Fn3}$, например

к своей 94-й аминокислоте (на основании нумерации аминокислот последовательности SEQ ID NO: 1). Фрагмент PmXn может быть связан через пептидную связь с 94-й аминокислотой фрагмента ¹⁰Fn3. Фрагмент PmXn может быть связан с фрагментом ¹⁰Fn3, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая гомологична таковой в SEQ ID NO: 1, или содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 или 2. Единственный остаток пролина на конце последовательности SEQ ID NO: 1 упоминается как "95Pro" или "Pro95" или "P95" или "95P".

Иллюстративные фрагменты ¹⁰Fn3, связанные с фрагментом PmXn, включают в себя следующие:

LEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG
VDYTTVVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (SEQ ID NO: 59)
VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTAT
ISGLKPGVDYTTVVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (SEQ ID NO: 60)

В PmXn m может быть равно 1, 2, 3 или более. Например, m может быть равно 1-3 или m может быть равно 1-2. "n" может быть равно 0, 1, 2, 3 или более, например n может быть равно 1-3 или 1-2.

Как дополнительно описано в настоящем документе эти фрагменты ¹⁰Fn3 могут быть модифицированы для связывания с мишенью (и образовывать фрагменты FBS), путем модификации аминокислотной последовательности одного или нескольких петель и/или одной или нескольких бета-нитей. Фрагменты FBS, которые связаны с PmXn, упоминаются в настоящем документе как "модифицированные фрагменты FBS". Соответственно, в настоящем документе предусмотрены белки, содержащие фрагмент FBS, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 50, 60, 70, 80, 90, или на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 59 или 60, причем белок содержит PmXn и причем FBS специфически связывается с мишенью (кроме как через RGD домен).

В PmXn p может быть равно 0 и в этом случае С-концевая аминокислота белка представляет собой Pm, например P. Согласно некоторым вариантам осуществления p не равно 0 и может составлять, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. Например, p может быть равно 0-10, 0-5, 0-3, 1-10, 1-5, 1-3 или 1-2. Тем не менее, более чем 10 аминокислот могут быть связаны с пролином. Например, в тандеме фрагмента FBS или фрагмента FBS, слитого с другим полипептидом, С-концевая аминокислота фрагмента FBS может быть связана с одним или несколькими пролинами, а последний пролин связан со вторым фрагментом FBS или с гетерологичным фрагментом. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления p может представлять собой целое число в диапазоне 0-100, 0-200, 0-300, 0-400, 0-500 или более.

Согласно некоторым вариантам осуществления PmXn содержит цистеин. Например, первая аминокислота после пролина может быть цистеином и цистеин может быть последней аминокислотой в молекуле или цистеин может следовать после одной или нескольких аминокислот. Наличие цистеина делает возможным конъюгацию гетерологичных остатков с фрагментом FBS, например химическими фрагментами, например ПЭГ. Иллюстративные фрагменты PmXn, содержащие цистеин, включают в себя: PmCXn, где С представляет собой цистеин. Другим примером может служить PmXn₁CXn₂, где n₁ и n₂ независимо представляют собой 0 или целое число, которое равно по меньшей мере 1. Например, n₁ может быть равно 1 и n₂ может быть равно 1, 2, 3, 4 или 5.

Иллюстративные фрагменты PmXn включают в себя те, которые перечислены в табл. 3.

Таблица 3. Иллюстративные фрагменты PmXn

Фрагменты с 1 пролином	Фрагменты с 2 пролинами
P	PP
PI	PPI
PC	PPC
PID	PPID
PIE	PPIE
PIDK (SEQ ID NO: 61)	PPIDK (SEQ ID NO: 62)
PIEK (SEQ ID NO: 63)	PPIEK (SEQ ID NO: 64)
PIDKP (SEQ ID NO: 65)	PPIDKP (SEQ ID NO: 66)
PIEKP (SEQ ID NO: 67)	PPIEKP (SEQ ID NO: 68)
PIDKPS (SEQ ID NO: 69)	PPIDKPS (SEQ ID NO: 70)
PIEKPS (SEQ ID NO: 71)	PPIEKPS (SEQ ID NO: 72)
PIDKPC (SEQ ID NO: 73)	PPIDKPC (SEQ ID NO: 74)

PIEKPC (SEQ ID NO: 75)	PPIEKPC (SEQ ID NO: 76)
PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77)	PPIDKPSQ (SEQ ID NO: 78)
PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79)	PPIEKPSQ (SEQ ID NO: 80)
PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81)	PPIDKPCQ (SEQ ID NO: 82)
PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83)	PPIEKPCQ (SEQ ID NO: 84)
PHNNHHH (SEQ ID NO: 85)	PPHNNHHH (SEQ ID NO: 86)
PCNNHHHH (SEQ ID NO: 87)	PPCNNHHHH (SEQ ID NO: 88)

За любым из фрагментов PmXn, например показанным в табл. 3, может следовать гистидиновый хвост, например тег bхHis или другой тег. Это не исключает того, что гистидиновый хвост может быть включен в PmXn.

Добавление фрагмента PmXn к фрагменту FBS усиливает одну или несколько характеристик фрагмента FBS. Например, как показано в примерах, он усиливает термостабильность фрагмента ¹⁰Fn3 по отношению к фрагменту, который не связан с фрагментом PmXn. Улучшение термостабильности, как ожидается, улучшит другие желаемые свойства, такие как растворимость, правильную укладку и уровень экспрессии. Например, как показано в примере, наличие фрагмента PmXn на С-конце FBS повышает растворимость FBS по отношению к FBS, который не связан с фрагментом PmXn.

Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления Tm фрагмента FBS, например ¹⁰Fn3, увеличивается по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15°C по отношению к фрагменту FBS, который не связан с фрагментом PmXn. Например, Tm может быть увеличена на 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 или 1-5°C по отношению к фрагменту FBS, который не связан с фрагментом PmXn. Tm может быть измерена с помощью термической сканирующей флуоресценции (TSF), например, следующим образом. Образцы белка, например образцы НТРР, нормализуют до 0,2 мг/мл в PBS. 1 мкл красителя оранжевого SYPRO®, разбавленного 1:40 PBS, добавляют к 25 мкл каждого образца, и планшет запечатывают чистой адгезивной прокладкой для 96-луночного микропланшета. Образцы сканируют с использованием прибора ОТ-ПЦР BioRad с помощью наращивания температуры от 25 до 95°C со скоростью 2 градуса в минуту. Данные анализируют с использованием программного обеспечения BioRad CFX manager 2.0. Tm также может быть измерена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) следующим образом. Раствор 0,5 мг/мл сканируют в VP-капиллярном дифференциальном сканирующем калориметре (GE Microcal) путем наращивания температуры от 15 до 110°C со скоростью 1 градус в минуту при давлении 70 p.s.i. Данные анализируют по сравнению с контрольным проходом соответствующего буфера с использованием наиболее подходящего варианта с помощью программного обеспечения Origin (OriginLab Corp).

Согласно некоторым вариантам осуществления растворимость фрагмента FBS усиливается посредством его связывания с фрагментом PmXn. Такая молекула может существовать в концентрации по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл.

Фрагменты PKE.

Фрагменты FBS могут быть связаны с фрагментами PKE, чтобы продлить период полураспада фрагментов FBS. Иллюстративные фрагменты PKE включают в себя сывороточный альбумин человека; белки, которые связываются с сывороточным альбумином человека (например, FBS, связывающийся с HSA или ABD); Fc или любую часть или вариант; и ПЭГ. Эти группы могут быть связаны N-концевой или С-концевой частью с фрагментом PmXn и/или FBS.

Конъюгированные с цистеином метки и лекарственные средства.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент FBS, связанный с фрагментом PmXn (и называемый "модифицированный фрагмент FBS"), в котором по меньшей мере одна или несколько аминокислот "X" представляют собой цистеин, связывают посредством одного или нескольких цистеинов с гетерологичным фрагментом, таким как фрагмент-метка, биологически активным фрагментом (например, лекарственным средством) или связывающим фрагментом.

Описанные в настоящем документе FBS фрагменты могут быть конъюгированы через С-концевой цистеин с лекарственным средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат FBS с лекарственным средством (FBS-DC, также "конъюгат аднектина с лекарственным средством").

В FBS-DC, FBS конъюгируют с лекарственным средством, с FBS, функционирующим как направленно действующее средство для направления FBS-DC к клетке-мишени, экспрессирующей антиген, такой как злокачественная клетка. Предпочтительно антиген представляет собой ассоциированный с опухолью антиген, т.е. тот, который уникально экспрессируется или сверхэкспрессируется злокачественной клеткой. После того, как лекарство высвобождается, либо внутри клетки-мишени или вблизи нее, оно действует как терапевтическое средство. Для обзора механизма действия и использования конъюгатов лекарственных средств, используемых с антителами, например, в терапии злокачественных опухолей, см. Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc, 5:147(2006).

Подходящие терапевтические средства для использования в конъюгатах лекарственных средств включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, участки связывания малой бороздки ДНК, интеркаляторы ДНК, сшивающие ДНК вещества, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протееосом, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белка теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимитотические средства. В FBS-DC, FBS и терапевтическое средство предпочтительно конъюгируют через расщепляемый линкер, такой как пептидный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 89), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. FBS-DC могут быть получены в соответствии со способами, аналогичными тем, которые описаны в патентах США № 7087600, 6989452 и 7129261; в публикациях PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; в публикациях патентов США № 2006/0024317; 2006/0004081 и 2006/0247295, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Линкер сам по себе может быть связан, например ковалентно связан, например, с использованием малеимидной химии, с цистеином фрагмента PmXn, где по меньшей мере один X представляет собой цистеин. Например, линкер может быть ковалентно связан с FBS-PmXn, где по меньшей мере один X представляет собой цистеин. Например, линкер может быть связан с FBS-PmCn, где P представляет собой пролин, C представляет собой цистеин, а m и n представляют собой целые числа, которые равны по меньшей мере 1, например 1-3. Лигирование к цистеину может быть выполнено, как известно в настоящей области техники, с использованием малеимидной химии (например, Imperiali, B. et al., Protein Engineering: Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 22, pp. 65-96, Gross, H.J., ed. (2009)). Для присоединения линкера к цистеину на FBS, линкер может, например, содержать малеимидный фрагмент, который затем взаимодействует с цистеином с образованием ковалентной связи. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислоты, окружающие цистеин, оптимизированы для облегчения химической реакции. Например, цистеин может быть окружен отрицательно заряженной аминокислотой для более быстрой реакции по отношению к цистеину, который окружен участком положительно заряженных аминокислот (EP 1074563).

Для лечения злокачественных опухолей лекарственное средство предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель нацеленной злокачественной клетки. Цитотоксические лекарственные средства, которые могут быть использованы в FBS-DC, включают в себя следующие типы соединений и их аналоги и производные:

(a) энедины, такие как калихеамицин (см., например, Lee et al., J. Am. Chem. Soc, 109:3464, 3466 (1987)) и унциаламицин (см., например, Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007) и Chowdari et al., патент США № 8709431 B2 (2012));

(b) тубулизины (см., например, Domling et al., патент США № 7778814 B2 (2010); Cheng et al., патент США № 8394922 B2 (2013) и Cong et al., публикация патента США 2014/0227295 A1);

(c) CC-1065 и дуокармицин (см., например, Boger, патент США № 65458530 B1 (2003); Sufi et al., патент США № 8461117 B2 (2013) и Zhang et al., публикация патента США № 2012/0301490 A1 (2012));

(d) эпогилоны (см., например, Vite et al., публикация США № 2007/0275904 A1 (2007) и патент США № RE42930 E (2011));

(e) ауристатины (см., например, Senter et al., патент США № 6844869 B2 (2005) и Doronina et al., патент США № 7498298 B2 (2009));

(f) димеры пирролобензодиазепина (PBD) (см., например, Howard et al., публикации патентов США № 2013/0059800 A1 (2013) и 2013/0028919 A1 (2013) и WO 2013/041606 A1 (2013)); а также

(g) мейтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., например, Chari et al., патент США № 5208020 (1993) и Amphlett et al., патент США № 7374762 B2 (2008)).

Согласно некоторым вариантам осуществления FBS-PmXn, в котором по меньшей мере один X представляет собой цистеин, связывают с меткой или регистрируемым фрагментом для использования, например для обнаружения или визуализации *in vitro* или *in vivo*.

Обнаруживаемые метки могут быть любого из различных типов, используемых в настоящее время в области диагностики *in vitro*, включая в себя метки в виде частиц, включая в себя такие металлические золи, как коллоидное золото, такие изотопы, как I¹²⁵ или Tc⁹⁹, представленные, например, с пептидным хелатирующим средством типа N₂S₂, N₃S или N₄, хромофоры, включающие в себя флуоресцентные маркеры, биотин, люминесцентные маркеры, фосфоресцирующие маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые преобразуют данный субстрат в обнаруживаемый маркер, и полинуклеотидные теги, выявляемые последующей амплификацией, такой как с помощью полимеразной цепной реакции. Биотинилированное антитело затем будет обнаруживаться с помощью связывания с авидином или стрептавидином. Подходящие ферментные метки включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и тому подобное. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, обнаруженную путем измерения наличия или образования миломинесценции в результате конверсии 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантилметоксифосфориллоксифенилдиоксетан (AMPPD), 3-(4-(метоксиспиро {1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло {3.3.1.1 3,7} декан}-4-ил)фенил)фосфат натрия (CSPD), а также CDP и CDP-STAR® или люминесцентные субстраты хорошо известные специалистам в настоящей об-

ласти техники, например хелаты подходящих лантанидов, таких как тербия (III) и европия (III).

Обнаруживаемые фрагменты, которые могут быть использованы, включают в себя следующие радиоактивные вещества: такие радиоактивные тяжелые металлы, как хелаты железа, радиоактивные хелаты гадолиния или марганца, источники позитронов кислорода, азота, железа, углерода или галлия, ^{18}F , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{124}I , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{11}C , ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{114}In , ^{125}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{123}I , ^{32}Cl , ^{33}Cl , ^{34}Cl , ^{74}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{78}Br , ^{89}Zr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{99}Tc , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac или ^{153}Sm .

Средства обнаружения определяются выбранной меткой. Визуальные характеристики метки или продуктов ее реакции могут быть видны невооруженным глазом, в том случае, когда метка представляет собой частицу и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием таких инструментов, как спектрофотометр, люминометр, флуорометр и т.п., все в соответствии со стандартной практикой.

Обнаружимый фрагмент может быть связан с цистеином в соответствии со способами, известными в настоящей области техники. Когда обнаруживаемый фрагмент представляет собой радиоактивное средство, например как те, которые описаны дополнительно в настоящем документе, обнаруживаемый фрагмент связывают с FBS через хелатирующее средство, которое может вступить в реакцию с остатками цистеина, такими как малеимид, содержащий такое хелатирующее средство, как малеимид-NODAGA или малеимид-DBCO. Малеимид-NODAGA или малеимид-DBCO может быть подвергнут взаимодействию с цистеином на С-конце FBS (например, с помощью фрагмента PmXn, в котором по меньшей мере один X представляет собой цистеин) с получением FBS-NODAGA или FBS-DBCO, соответственно. Любое одно из следующих хелатирующих средств может быть использовано при условии, что оно содержит или может быть модифицировано, чтобы содержать реакционноспособный фрагмент, который вступает в реакцию с остатками цистеина: DFO, DOTA и его производные (основанные на CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, Охо-DO3A), TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar и его производные, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA и его производные (DATA), H₂dedpa, H₄octapa, H₂azapa, H₂decapa, H₆phospa, NBED, SHBED, ВРСА, СР256, РСТА, НЕНА, РЕРА, EDTA, TETA и TRITA хелатирующие средства и их близкие аналоги и производные.

Согласно некоторым вариантам осуществления FBS метят с помощью меченого ПЭТ и используют в качестве средства для получения изображения *in vivo*. Например, FBS может быть помечено посредством меченого ^{64}Cu ПЭТ. ^{64}Cu может быть связана с FBS посредством С-концевого цистеина с хелатирующим средством, таким как малеимид-NODAGA.

Иллюстративные молекулы.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок содержит (I) фрагмент FBS, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 1-16; и (II) PmXn, где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту, m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и n равно 0 или представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, причем белок специфически связывается с мишенью (например, с K_d менее чем 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ или менее, как определено, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), такого как Biacore), и причем фрагмент PmXn улучшает по меньшей мере одно свойство фрагмента FBS по отношению к белку, состоящему из немодифицированного фрагмента FBS.

Согласно некоторым вариантам осуществления улучшенное свойство, предоставляемое фрагментом PmXn, представляет собой повышенную стабильность белка, например повышенную температуру плавления (T_m), по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 1-15, 2-15, 3-15, 5-15, 5-15, 1-10, 2-10, 3-10, 4-10 или 5-10°C. T_m может быть определена, например, путем термической сканирующей флуоресценции (TSF) или с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). "Увеличенная T_m" относится к статистически достоверному повышению T_m.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок, содержащий фрагмент FBS и фрагмент PmXn, присутствует в композиции, например фармацевтической композиции, в концентрации по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок, содержащий фрагмент FBS и фрагмент PmXn, присутствует в композиции, например фармацевтической композиции, в основном в виде мономера, например по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% белка в композиции находится в мономерной форме. Степень мономерности раствора белка может быть определена с помощью гель-фильтрационной хроматографии (SEC), например, с использованием колонки Superdex (GE Healthcare) на системе ВЭЖХ 1100 или 1200 Agilent с УФ-обнаружением при A₂₁₄ нм и A₂₈₀ нм и с флуоресцентным обнаружением (возбуждение=280 нм, эмиссия=350 нм). Может быть использован буфер, содержащий 100 мМ сульфата натрия, 100 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорида натрия, (например, pH 6,8), при соответствующей скорости потока колонки SEC. Стандарты для гель-фильтрации (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) используют для калибровки молекулярной массы.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок, содержащий фрагмент FBS и фрагмент PmXn, обладает биологической активностью, которая по меньшей мере так же сильна, как и у немоди-

фицированного фрагмента FBS. Биологическая активность может представлять собой аффинность связывания с мишенью или биологическую активность в анализе, например способность уничтожать опухолевые клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления биологическая активность белка находится в пределах 5, 10, 25, 50, 100%, 2-кратной или более активности немодифицированного фрагмента FBS.

Белок, содержащий FBS и фрагмент PmXn, также может содержать комбинацию указанных выше свойств. Например, белок может быть растворимым в концентрации до 50 мг/мл, присутствовать по меньшей мере на 90% в мономерной форме и/или обладать биологической активностью, которая по меньшей мере столь же мощная, как и у немодифицированного FBS.

При обращении к усиленному свойству, повышение представляет собой статистически значимое повышение.

Технология нуклеиновых кислот с белками.

Одним из способов быстро получить и проверить домены FBS со специфическими связывающими свойствами является технология нуклеиновых кислот с белками Adnexus, Bristol-Myers Squibb Company. Такая технология экспрессии и мечения, названная Profusion, которая использует слияния нуклеиновых кислот с белками (слияния РНК- и ДНК-белок), может быть использована для идентификации новых мотивов полипептидов и аминокислот, которые являются важными для связывания с белками. Технология нуклеиновых кислот с белками представляет собой технологию, которая ковалентно соединяет пары белка с его кодирующей генетической информацией. Для подробного описания технологии РНК-белок и способа сканирования библиотеки основанных на фибронектине каркасных белков см. Szostak et al., патенты США № 6258558; 6261804; 6214553; 6281344; 6207446; 6518018; публикации PCT WO 00/34784; WO 01/64942; WO 02/032925 и Roberts et al., Proc Natl. Acad. Sci., 94:12297-12302 (1997), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Варианты осуществления векторов и полинуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любые из различных белков, содержащих раскрытые в настоящем документе фрагмент FBS и фрагмент PmXn, могут быть синтезированы химическим, ферментативным или рекомбинантным способом. Частота использования кодонов может быть выбрана таким образом, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такая частота использования кодонов будет зависеть от выбранного типа клеток. Были разработаны специализированные профили частоты использования кодонов для *E. coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, клеток растений, клеток дрожжей и клеток насекомых. См., например: Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5):446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996) и Sharp et al., Yeast, 7(7):657-678 (Oct. 1991).

Общие техники манипуляций с нуклеиновыми кислотами описаны, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) или Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) и периодических обновлениях, включенных в настоящий документ посредством ссылки. ДНК, кодирующая полипептид, функционально связана с подводящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, полученными из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают в себя промотор транскрипции, необязательную последовательность оператора для управления транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящую сайты связывания с рибосомами мРНК, и последовательности, которые контролируют прекращение транскрипции и трансляции. Дополнительно включена способность к репликации у хозяина, как правило, предоставляемая точкой начала репликации и геном селекции, чтобы облегчить распознавание трансформантов.

Белки, описанные в настоящем документе, могут быть получены рекомбинантным способом не только непосредственно, но и в виде полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбираемая гетерологичная сигнальная последовательность представляет собой ту, которая распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают нативную сигнальную последовательность, сигнальная последовательность заменяется прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, содержащей щелочную фосфатазу, пенициллиназу, Ippr или лидерные последовательности термостабильного энтеротоксина II. Для секреции дрожжей нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью дрожжевой инвертазы, лидерной последовательностью фактора (включая в себя лидерные последовательности альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *S. albicans* или сигналом, описанным в публикации PCT WO 90/13646. В экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнал gD простого герпеса. ДНК для таких областей предшественников, могут быть лигированы в рамке считывания с ДНК, кодирующей белок.

Как векторы экспрессии, так и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет репликацию вектора в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой ту, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает в себя точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации плазмиды 2 μ подходит для дрожжей и различные вирусные точки начала репликации (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) применимы для векторов клонирования в клетках млекопитающих. Как правило, компонент точки начала репликации не является необходимым для экспрессирующих векторов млекопитающих (точку начала репликации SV40, как правило, можно использовать только потому, что она содержит ранний промотор).

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген селекции, также называемый селективным маркером. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) дополняют ауксотрофные дефициты или (с) снабжают необходимыми питательными веществами, не доступными из сложных сред, например ген, кодирующий D-аланинрацемазу для бактерий.

Подходящим геном селекции для использования в дрожжах является ген *trp1*, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)). Ген *trp1* обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишённого способности расти в триптофане, например ATCC® No. 44076 или PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). Наличие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективное окружение для обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана. Точно так же, *Leu2*-дефицитные штаммы дрожжей (ATCC® 20622 или 38626) дополняются известными плазмидами, несущими ген *Leu2*.

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок. Промоторы, подходящие для использования в прокариотических хозяевах, включают в себя промотор *phoA*, бета-лактамазные и лактозные промоторные системы, щелочную фосфатазную, триптофановую (*trp*) промоторную систему, а также гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Тем не менее, подходят и другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с кодирующей белок ДНК.

Известны промоторные последовательности для эукариот. Практически все эукариотические гены содержат АТ-богатую область, расположенную приблизительно в 25-30 оснований выше против хода транскрипции от сайта инициации транскрипции. Другой последовательностью, обнаруженной в 70-80 основаниях выше против хода транскрипции от начала транскрипции многих генов, является область CNCAAT (SEQ ID NO: 109), где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA (SEQ ID NO: 110), которая может быть сигналом для добавления поли-А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответствующим образом вставлены в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в хозяевах-дрожжах включают в себя промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как энлаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкоизомераза и глюкокиназа.

Другие дрожжевые промоторы, которые представляют собой индуцируемые промоторы, имеющие дополнительное преимущество транскрипции под контролем условий роста, представляют собой промоторные области для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, разрушающих ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения в экспрессии дрожжей дополнительно описаны в патентной публикации EP № 73657 и публикациях PCT № WO 2011/124718 и WO 2012/059486. Дрожжевые энхансеры также преимущественно используются с дрожжевыми промоторами.

Транскрипцию из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих можно регулировать, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотор ACTIN® или иммуноглобулиновый промотор, из промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 легко получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусную точку начала репликации SV40. Предранний промотор цито-

мегаловируса человека легко получают в виде фрагмента рестрикции HindIII-E. Система для экспрессии ДНК в млекопитающих-хозяевах, использующая вирус бычьей папилломы в качестве вектора, описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., *Nature*, 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК β-интерферона человека в клетках мышцы под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса может быть использован в качестве промотора.

Транскрипция кодирующей белок ДНК с помощью высших эукариот часто усиливается путем вставки последовательности энхансера в вектор. Многие последовательности энхансера известны в настоящее время из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α-фетопротеина и инсулина). Как правило, тем не менее, будет использоваться энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают в себя энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. См. также Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) в отношении энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть повергнут сращиванию в вектор в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид, но предпочтительно расположен в сайте 5' от промотора.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядродержащих из других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности, как правило, доступны из 5', время от времени, 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей полипептид. Один полезный компонент терминации транскрипции представляет собой область полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. публикацию международной заявки WO 94/11026 и раскрытый в ней вектор экспрессии.

Рекомбинантная ДНК может также включать в себя любой тип последовательности белкового тега, которая может быть полезна для очистки белков. Примеры белковых тегов включают в себя без ограничения гистидиновый тег, тег FLAG®, тег мус, тег HA или тег GST. Соответствующие векторы клонирования и экспрессии для использования с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих могут быть найдены в *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York (1985), соответствующее описание которой приведено в настоящем документе посредством ссылки.

Конструкция экспрессии может быть введена в клетку-хозяина с использованием способа, соответствующего клетке-хозяину, как будет очевидно специалисту в настоящей области техники. В настоящей области техники известны различные способы введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, включая в себя без ограничения электропорацию; трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорид рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфекцию (где вектор представляет собой инфекционный патоген).

Подходящие клетки-хозяева включают в себя прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают в себя грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или *Bacillus spp.* Дрожжи, предпочтительно видов *Saccharomyces*, таких как *S. cerevisiae*, также могут быть использованы для получения полипептидов. Различные системы культур клеток млекопитающих или насекомых также могут быть использованы для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для производства гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются Luckow et al. (*Bio/Technology*, 6:47 (1988)). Примеры подходящих линий млекопитающих клеток-хозяев включают в себя клеточные линии эндотелиальных клеток, клеток почки обезьяны COS-7, CV-1, L-клеток, C127, 3T3, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток эмбриональной почки человека, HeLa, 293, 293T и ВНК. Очищенные белки получают культивированием подходящих систем хозяин/вектор для экспрессии рекомбинантных белков. Белок FBS затем очищают от культуральной среды или клеточных экстрактов.

Производство белка.

Клетки-хозяева трансформируют с описанными в настоящем документе экспрессирующими или клонирующими векторами для производства белка и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для получения белков, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Хама F10 (Sigma), минимальная эссенциальная среда ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM) (Sigma)) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанная в Ham et al., *Meth. Enzymol.*, 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), в патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; в публикации PCT WO 90/03430; WO 87/00195 или патенте США № RE30985, мо-

гут быть использованы в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть дополнена при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамициновые лекарственные средства), микроэлементами (определенными как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Также могут быть включены в соответствующих концентрациях любые другие необходимые добавки, которые должны быть известны специалистам в настоящей области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой те, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны каждому специалисту в настоящей области техники.

Белки, описанные в настоящем документе, также могут быть получены с использованием бесклеточных системах трансляции. Для таких целей нуклеиновые кислоты, кодирующие белок, должны быть модифицированы, чтобы позволить транскрипции *in vitro* производить мРНК и чтобы позволить бесклеточную трансляцию мРНК в конкретной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная система трансляции млекопитающих или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная система трансляции).

Белки также могут быть получены путем химического синтеза (например, с помощью способов, описанных в *Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)*). Модификации в белке также могут быть получены с помощью химического синтеза.

Описанные в настоящем документе белки могут быть очищены с помощью способов выделения/очистки для белков, как правило, известных в настоящей области химии белков. Не ограничивающие примеры включают в себя экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, с сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обратно-фазовую хроматографию, гель-фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки белки могут быть помещены в различные буферы и/или концентрированы любым из множества способов, известных в настоящей области техники, включая в себя без ограничения фильтрацию и диализ.

Очищенный белок предпочтительно характеризуется чистотой по меньшей мере 85, более предпочтительно по меньшей мере 95 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 или 99%. Независимо от точного числового значения чистоты, белок является достаточно чистым для использования в качестве фармацевтического продукта.

Иллюстративное применение.

Модифицированные белки FBS могут быть использованы для любых целей, для которых могут быть использованы белки FBS, которые не модифицированы добавлением фрагмента PmXn.

Согласно одному аспекту в заявке предусмотрены белки, содержащие модифицированный фрагмент FBS, который применим в лечении нарушений. Заболевания или нарушения, которые можно лечить, будут продиктованы специфичностью связывания фрагмента FBS. Как описано в настоящем документе, модифицированные фрагменты FBS могут быть разработаны, чтобы связываться с любой представляющей интерес мишенью. Иллюстративные мишени включают в себя, например, TNF-альфа, VEGFR2, PCSK9, ИЛ-23, EGFR и IGF1R. Всего лишь в качестве примера, модифицированные фрагменты FBS, которые связываются с TNF-альфа, могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, псориаз и астма. Описанные в настоящем документе модифицированные белки FBS могут также быть использованы для лечения злокачественной опухоли.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения субъекта, характеризующегося наличием заболевания, например злокачественной опухоли, предусматривает введение субъекту конъюгата модифицированного FBS с лекарственным средством.

В настоящем документе предусмотрены способы введения белков субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления белки представляют собой фармацевтически приемлемые для млекопитающих, в частности, человека. Термин "фармацевтически приемлемая" композиция относится к композиции, которую вводят животному без значительных неблагоприятных медицинских последствий. Примеры фармацевтически приемлемых композиций включают в себя композиции, содержащие фрагменты FBS, которые не содержат интегрин-связывающий домен (RGD), и композиции, которые по существу свободны от эндотоксинов или пирогенов или содержат очень низкое количество эндотоксина или пирогена.

Другие виды применения описанных в настоящем документе модифицированных белков FBS включают в себя их использование в анализах для обнаружения *in vitro* или *in vivo*. Например, они могут быть использованы для обнаружения молекулы-мишени в образце. Способ может предусматривать контактирование образца с описанным в настоящем документе модифицированным FBS, причем указанное

контактирование осуществляют в условиях, обеспечивающих образование комплекса FBS-мишень; и обнаружение указанного комплекса, тем самым обнаруживая указанную мишень в указанном образце. Обнаружение может быть осуществлено с использованием любой признанной в настоящей области техники, такой как, например, рентгенография, иммунологический анализ, флуоресцентное обнаружение, масс-спектроскопия или поверхностный плазмонный резонанс. Образец может быть из организма человека или другого млекопитающего. Для диагностических целей соответствующие средства могут представлять собой обнаруживаемые метки, которые включают в себя радиоизотопы, для визуализации всего тела, и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие теги-антитела для исследования образцов.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный описанный в настоящем документе FBS применим в различных приложениях для диагностики и визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный FBS метят фрагментом, который обнаруживается *in vivo*, и такие меченые FBS могут быть использованы в качестве визуализирующего средства *in vivo*, например для визуализации всего тела. Например, согласно одному варианту осуществления способ обнаружения опухоли, содержащей данный антиген у субъекта, предусматривает введение субъекту модифицированного FBS, связанного с обнаруживаемой меткой, и после установленного времени, обнаружение метки в субъекте.

Визуализирующее средство FBS может быть использовано для диагностики нарушения или заболевания, связанного с повышенным содержанием данного антигена, например злокачественной опухоли, в котором опухоль селективно сверхэкспрессирует антиген. Аналогичным образом, модифицированный FBS, который специфически связывается с данным антигеном, может быть использован для контроля содержания антигена у подлежащего лечению субъекта на состояние, связанное с антигеном. Модифицированный FBS может быть использован с модификацией или без нее и может быть помечен путем ковалентного или нековалентного прикрепления обнаруживаемого фрагмента.

Состав и введение.

В заявке дополнительно предусмотрены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие описанные в настоящем документе белки, причем композиция по существу свободна от эндотоксинов и/или пирогенов.

Терапевтические составы, содержащие белки, получают для хранения путем смешивания описанных белков, характеризующихся требуемой степенью чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition (1980)) в форме водных растворов, лиофилизированными или другими сухими составами. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы представляют собой нетоксичные для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая в себя аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (приблизительно менее 10 остатков) полипептиды; такие белки, как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; такие гидрофильные полимеры, как поливинилпирролидон; такие аминокислоты, как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая в себя глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; такие сахара, как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; такие солеобразующие противоионы, как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, PLURONIC® или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Составы согласно настоящему изобретению также могут содержать более одного активного соединения, как необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно те, с комплементарной активностью, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Такие молекулы могут присутствовать в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемых целей.

Белки могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или путем межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие способы описаны в Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition (1980).

Составы, предназначенные для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих описанные в настоящем документе белки, при этом матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобож-

днем включают в себя сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, неразлагающийся этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT® (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, способны высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные белки остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации представляет собой образование межмолекулярных S-S связей через тио-дисульфидный обмен, то стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контролированием содержания влаги, использованием соответствующих добавок и разработкой специфических полимерных матричных композиций.

В то время как специалист в настоящей области техники поймет, что дозировка каждого белка будет зависеть от идентичности белка, предпочтительные дозы могут варьировать в диапазоне от приблизительно 10 мг/квадратный метр до приблизительно 2000 мг/квадратный метр, более предпочтительно от приблизительно 50 мг/квадратный метр до приблизительно 1000 мг/квадратный метр.

Для терапевтических применений, белки вводят субъекту в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. Их можно вводить внутривенно в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, путем внутримышечного, подкожного, внутрисуставного, интрасиновиального, интратекального, перорального, местного введения или путем ингаляции. Белок можно вводить также внутриопухолевым, перитуморальным, внутриочаговым или периочаговым маршрутом, для оказания местных, а также системных терапевтических эффектов. Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и вспомогательные вещества хорошо известны и могут быть определены специалистами в настоящей области техники как гаранты клинической ситуации. Примеры подходящих носителей, разбавителей и/или вспомогательных веществ включают в себя: (1) фосфатный буферный раствор Дульбекко, pH приблизительно 7,4, содержащий приблизительно от 1 до 25 мг/мл сывороточного альбумина человека, (2) 0,9% физиологический раствор (0,9% в отношении массы к объему NaCl) и (3) 5% (в отношении массы к объему) раствор декстрозы. Способы согласно настоящему изобретению могут быть осуществлены *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Введение белков, а также одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, как совместно вводимых, так и вводимых последовательно, может осуществляться, как описано выше для терапевтического применения. Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и вспомогательные вещества для совместного введения, как будет понятно специалисту в настоящей области техники, зависят от идентичности конкретного терапевтического средства для совместного введения.

Когда присутствует в водной лекарственной форме, а не лиофилизованной, белок, как правило, будет составлен в концентрации приблизительно от 0,1 до 100 мг/мл, хотя широкое разнообразие за пределами этих диапазонов допускается. Для лечения заболевания соответствующая доза белков будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, тяжести и течения заболевания, от того, вводят белки в профилактических или терапевтических целях, курса предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на слияние, и от усмотрения лечащего врача. Белок соответственно вводят пациенту один раз или в течение нескольких воздействий.

Иллюстративные варианты осуществления.

1) Выделенный основанный на фибронектине каркасный (FBS) белок, который специфически связывается с мишенью, причем FBS представляет собой не встречающийся в природе FBS и причем FBS связан на С-конце с фрагментом, состоящим из аминокислотной последовательности P_mX_n , где P представляет собой пролин, X представляет собой любую аминокислоту, m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и n равно 0 или представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и где фрагмент P_mX_n обеспечивает улучшенное свойство белка FBS относительно белка FBS, который не связан с фрагментом P_mX_n .

2) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из P (m равно 1 и n равно 0).

3) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PP (m равно 2 и n равно 0).

4) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из P_mX_n , в котором n составляет от 1 до 150.

5) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из P_mX_n , в котором n составляет от 1 до 10.

6) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из P_mX_n , в котором n составляет от 1 до 5.

7) Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 61), PIEK (SEQ ID NO: 63), PIDKP (SEQ ID NO: 65), PIEKP (SEQ ID NO: 67), PIDKPS (SEQ ID NO: 69), PIEKPS (SEQ ID NO: 71), PIDKPC (SEQ ID NO: 73), PIEKPC (SEQ ID NO: 75), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83), PNNNNN (SEQ ID NO: 87) или PCHNNNNN (SEQ ID NO: 86).

8) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-7, причем белок FBS представляет собой белок Fn3.

9) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 8, причем белок Fn3 представляет собой белок ¹⁰Fn3.

10) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 9, причем белок ¹⁰Fn3 представляет собой человеческий белок ¹⁰Fn3.

11) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-10, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

12) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-11, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию по меньшей мере в одной петле или одной каркасной области.

13) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-12, содержащий аминокислотную последовательность VSDVPRDLEV-VAA(X)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zISIN YRT (SEQ ID NO: 9), в которой (X)_u, (X)_v, (X)_w, (X)_x, (X)_y и (X)_z состоят из аминокислотной последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1) или содержат по меньшей мере одно отличие аминокислот от соответствующей последовательности дикого типа, а последовательность необязательно содержит от 1 до 10 мутаций каркаса, N-конца и/или C-конца.

14) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-13, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, и в которой C-концевой аминокислотный остаток белка FBS слит с фрагментом, состоящим из PmXn, в котором белок FBS специфически связывается с мишенью с Kd менее чем 500 нМ, причем мишень не связывается молекулой ¹⁰Fn3 дикого типа, содержащей SEQ ID NO: 1.

15) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 14, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

16) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-15, в котором фрагмент, состоящий из PmXn, связан с C-концевым аминокислотным остатком белка FBS через пептидную связь.

17) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-16, в котором PmXn представляет собой P или PC.

18) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-17, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, и в которой C-концевой аминокислотный остаток белка FBS связан с пролином через пептидную связь, и в которой указанный белок FBS специфически связывается с мишенью с Kd менее чем 500 нМ, при этом мишень не связывается молекулой ¹⁰Fn3 дикого типа, содержащей SEQ ID NO: 1.

19) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором по меньшей мере один X из PmXn представляет собой цистеин.

20) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 19, в котором цистеин конъюгирован с гетерологичным фрагментом.

21) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 20, в котором гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемый фрагмент.

22) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 20 или 21, в котором гетерологичная молекула представляет собой фрагмент лекарственного средства, и фрагмент лекарственного средства и FBS образуют конъюгат FBS с лекарственным средством.

23) Выделенный белок FBS по любому из вариантов осуществления 1-22, в котором улучшенное свойство, предоставляемое фрагментом PmXn, представляет собой повышенную стабильность.

24) Выделенный белок FBS согласно варианту осуществления 23, в котором повышенная стабильность представляет увеличение Tm по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5°C или более.

Следующие репрезентативные примеры содержат важную дополнительную информацию, иллюстративный пример и руководство к действию, которые могут быть адаптированы к практике настоящего изобретения в его различных вариантах осуществления и их эквивалентах. Эти примеры предназначены, чтобы помочь проиллюстрировать изобретение, и как не предназначены, так и они не должны быть истолкованы как ограничивающие его объем.

Примеры

Пример 1. Повышение термостабильности путем добавления пролина на C-конце молекул ¹⁰Fn3.

В природе, ¹⁰Fn3 представляет собой часть длинной цепочки доменов фибронектина типа III; домен непосредственно ниже по ходу транскрипции от ¹⁰Fn3 называется ¹¹Fn3. Последовательность ниже показывает последовательности областей ¹⁰Fn3 (курсив) и ¹¹Fn3 (выделена жирным шрифтом) дикого типа и

соединение между ними (подчеркнуто).

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQFEFTVPGSKSTATISGLK
PGVDYITTVYAVTGRGDPASSKPISINRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVT
GYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTEIQLQPTVEYVVSVAQNPSGESQLPLVQT
AVT (SEQ ID NO: 90)

На основе кристаллических и ЯМР структур $^{10}\text{Fn3}$ и выравнивания последовательностей между $^{10}\text{Fn3}$ и $^{11}\text{Fn3}$ (Dickinson et al., "Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin", J. Mol. Biol., 36:1079-1092 (1994)), первые два остатка этой последовательности, RT, представляют собой часть конечной бета-нити $^{10}\text{Fn3}$ ("нить G"), а остальная часть последовательности, EIDKPSQ, представляет собой гибкий линкер между структурированным десятым и одиннадцатым доменами фибронектина типа III.

С-конец сконструированных доменов белка на основе $^{10}\text{Fn3}$ часто модифицируется из последовательности дикого типа, чтобы облегчить его клонирование, экспрессию и очистку. Во время обследования различных сконструированных С-концов аднектинов было установлено, что мутация из RTE к RTP приводила к увеличенной термостабильности нескольких различных аднектинов. В табл. 4 перечислены различные С-концы, используемые в настоящем исследовании.

Таблица 4. Линкер дикого типа между $^{10}\text{Fn3}$ и $^{11}\text{Fn3}$ и сконструированные С-концевые последовательности аднектинов, которые сравнивали в настоящем исследовании.

"Короткий сконструированный С-конец с Р и His-тегом" и "короткий сконструированный С-конец с РС" содержат мутацию RTE в RTP

Описание	Последовательность	Цель	Комментарии
Соединение дикого типа между $^{10}\text{Fn3}$ и $^{11}\text{Fn3}$	RTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 91)	природная человеческая последовательность	содержит RTE
Длинный сконструированный С-конец с His-тегом	RTEIEKPSQH ₆ (SEQ ID NO: 92)	H ₆ делает возможной очистку посредством металл-хелатной хроматографии	содержит RTE; мутацию DK- >EK, которая уменьшает чувствительность к протеазам
Короткий сконструированный С-конец с Р и His-тегом	RTPH ₆ (SEQ ID NO: 93)	H ₆ делает возможной очистку посредством металл-хелатной хроматографии	содержит RTP
Короткий сконструированный С-конец с ЕС	RTEC (SEQ ID NO: 94)	С позволяет сайт- специфическую модификацию с использованием маленимидной химии	содержит RTE; не содержит тегов очистки
Короткий сконструированный С-конец с РС	RTPC (SEQ ID NO: 95)	С позволяет сайт- специфическую модификацию с использованием маленимидной химии	содержит RTP; не содержит тегов очистки

Влияние мутации из RTE в RTP на термостабильность аднектинов исследовали путем сравнения нескольких пар аднектинов, которые различались своими С-концами. В табл. 5 описаны пары аднектинов, используемые в настоящем исследовании, включая в себя их названия, мишени и термодинамические свойства. Аднектин 1 представляет собой аднектин, который связывается с мишенью X. Все перечисленные аднектины были выбраны из библиотек высокой сложности с использованием технологии PROfusion (мРНК-дисплея), а их С-концы сконструированы с помощью сайт-направленного мутагенеза. Полные последовательности белка приведены ниже.

Таблица 5. Название клона, С-конец, мишень и температура плавления (определенные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии при 0,5 мг/мл, в PBS, pH 7,4). Аднектины PRD-1414 и PRD-1417 конъюгировали с разветвленным ПЭГ размером 40 кДа с двумя ветвями (NOF, номер в каталоге GL2-400MA01)

ID белка (RTE), С-конец	ID белка (RTP), С-конец	Мишень	T _m (RTE)	T _m (RTP)	Увеличение в T _m содержащего RTP белка по отношению к содержащему RTE белку
ADX_2382_D09 RTEIEKPSQH ₆ (SEQ ID NO: 92)	ADX_5484_A03 RTPH ₆ (SEQ ID NO: 93)	PCSK9	84 °C	87 °C	+3 °C
ADX_2987_H07 RTEIEKPSQH ₆ (SEQ ID NO: 92)	ADX_5484_A04 RTPH ₆ (SEQ ID NO: 93)	Миостати н	56 °C	57 °C	+1 °C
PRD-1414 RTEC-PEG (SEQ ID NO: 94)	PRD-1417 RTPC-PEG (SEQ ID NO: 95)	PCSK9	64 °C	76 °C	+12 °C
Аднектин 1 RTEIEKPSQH ₆ (SEQ ID NO: 94)	Аднектин 1 RTPH ₆ (SEQ ID NO: 95)	X	61 °C	64 °C, 72 °C	+3 °C, +11 °C

Аминокислотные последовательности белков, используемых в этом примере: ADX_2382_D09:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG
TATISGLKPGVDYITIVYAVEFDPPGAGYYHRPISINYRTEIDKPSQHNNNNH* (SEQ
ID NO: 96)

ADX_5484_A03:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG
TATISGLKPGVDYITIVYAVEFDPPGAGYYHRPISINYRTPHNNNNH* (SEQ ID NO: 97)

ADX_2987_H07:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRG
VTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTEIDKPSQHNNNNH* (SEQ
ID NO: 97)

ADX_5484_A04:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRG
VTATISGLKPGVDYITIVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTPHNNNNH* (SEQ ID NO: 98)

PRD-1414:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG
TATISGLKPGVDYITIVYAVEFDPPGAGYYHRPISINYRTEC* (SEQ ID NO: 99)

PRD-1417:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKG
TATISGLKPGVDYITIVYAVEFDPPGAGYYHRPISINYRTPC* (SEQ ID NO: 100)

"*" в каждой последовательности выше обозначает стоп-кодон и С-конец каждого аднектина.

(ПЭГ) при добавлении С-концевого пролина. Повышение стабильности может быть связано с наличием пролина в данном конкретном положении.

Пример 2. Стабилизация второго аднектина PCSK9 с С-концевым пролином.

Этот пример показывает, что термостабильность другой молекулы аднектина PCSK9 также усиливается после добавления С-концевого пролина.

В этом примере С-конец пегилированного (разветвленный ПЭГ, 40 кДа) аднектина PCSK9 ADX2013E01 модифицировали из NYRTEIEKPCQ (SEQ ID NO: 101) в NYRTPC (SEQ ID NO: 102), и

термостабильность измеряли посредством TSF. Аминокислотная последовательность этого аднектина представлена в публикации WO 2011/130354. Результаты показывают, что пегилированный аднектин с С-концом NYRTEIEKPCQ (SEQ ID NO: 101) характеризуется Tm 70°C, в то время как пегилированный аднектин с С-концом NYRTPC (SEQ ID NO: 102) характеризуется Tm 76°C.

Таким образом, термостабильность этого аднектина PCSK9 усиливается на 6°C при наличии С-концевого пролина.

Пример 3. Сравнение влияния наличия различных С-концов на термостабильность.

Этот пример показывает сравнение термостабильности аднектинов с пролином или без него на их С-концах, а также аднектинов, содержащих 2 пролина на их С-концах.

Два из аднектинов, описанных в примере 1 (ADX2392D09, связывающийся с PCSK9, и ADX2987H07, связывающийся с миостатином) и один дополнительный аднектин, связывающийся с другой мишенью (аднектин 1, связывающийся с мишенью X), модифицировали на их С-конце, как указано в табл. 6, и определяли их термостабильность и % мономеров. Аднектин ("аднектин 1") к другой мишени (X) также модифицировали с теми же С-концевыми последовательностями. Термостабильность определяли посредством TSF, а % мономеров определяли посредством SEC.

Таблица 6 Процент мономеров и термостабильность аднектинов с различными С-концами

Исх.\ С-конец	NYRTEIEKPSQH ₆ (SEQ ID NO: 103)	NYRTH ₆ (SEQ ID NO: 104)	NYRTPH ₆ (SEQ ID NO: 105)	NYRTPPH ₆ (SEQ ID NO: 106)
ADX_2392_D09	>99%	>99%	>99%	99%
PCSK9	84°C	83°C	87°C	87°C
ADX_2987_H07	99%	>99%	>99%	>99%
Миостатин	56°C	51°C	57°C	57°C
Аднектин 1	~ 8%	>99%	>98%	>98%
Мишень X	61°C	58°C	64°C, 72°C	64°C, 72°C

Результаты, которые изложены в табл. 6, показывают, что идентичность С-конца не оказывает существенного влияния на % мономера, тем не менее, она оказывает влияние на температуру плавления (Tm). Как описано в примере 1, NYRTPH₆ (SEQ ID NO: 105) повышает термостабильность, по сравнению с NYRTH₆ (SEQ ID NO: 104) для обоих аднектинов: на 4°C для аднектина PCSK9 и на 6°C для миостатинового аднектина. Кроме того, наличие второго пролина обеспечивает стабилизирующий эффект, который подобен таковому при наличии одного пролина.

Таким образом, наличие одного или двух С-концевых пролинов повышает термостабильность аднектинов по отношению к той же самой молекуле без С-концевого пролина(ов).

Пример 4. Добавление С-концевого пролина повышает растворимость.

Этот пример показывает, что наличие С-концевого пролина повышает растворимость tandemного аднектина по отношению к тому же tandemному аднектину без С-концевого пролина.

Тандем аднектина, т.е. два аднектина, каждый из которых связан с другой мишенью, связанные с помощью линкера и содержащие либо NYRTE (SEQ ID NO: 107), либо NYRTP (SEQ ID NO: 108) С-конец, экспрессировали в клетках BLR E.coli и ферментировали при температуре 30°C. Титр тандема без пролина составлял 1,2 г/л растворимого белка и 2,8 г/л общего белка, что свидетельствует о том, что экспрессируемый белок был растворимым на 43%. Титр тандема с пролином составлял 2,56 г/л растворимого и 2,61 г/л общего белка. Даже после ренатурации нерастворимой фракции тандема без пролина и получения раствора, который был чистым на 98% и мономерным в дозе 2,5 мг/мл, эта белковая композиция не показала значительного связывания с мишенью, предполагая, что она не может быть должным образом ренатурирована.

Таким образом, принимая во внимание, что единственное различие между этими двумя белками заключалось в наличии Е по сравнению с Р на С-конце, результаты показывают, что наличие пролина обеспечивает повышенную растворимость тандема.

Полное раскрытие каждого цитируемого документа (включая в себя патенты, патентные заявки, журнальные статьи, рефераты, лабораторные пособия, книги, номера доступа GENBANK®, номера доступа SWISS-PROT® или другие раскрытия) в предшествующем уровне техники настоящего изобретения, подробном описании, кратком описании графических материалов и примерах полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

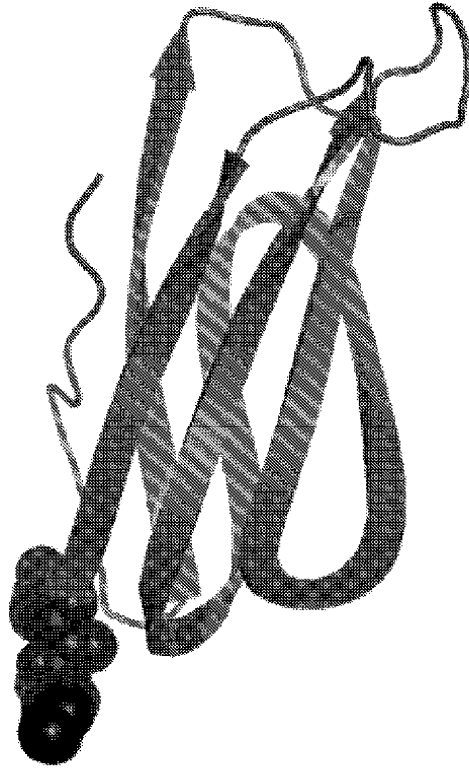
Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме раскрытыми в настоящем документе вариантами осуществления, которые предназначены выступать в качестве иллюстраций отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные варианты осуществления находятся в пределах объема настоящего изобретения. Различные модификации моделей и способов согласно настоящему изобретению в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для

специалистов в настоящей области техники из приведенного выше описания и исследований и аналогичным образом предназначены, чтобы подпадать под объем настоящего изобретения. Такие модификации и другие варианты осуществления могут быть выполнены без отхода от истинного объема и сущности настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный основанный на фибронектине каркасный (FBS) белок, содержащий домен $^{10}\text{Fn3}$ где
 - (i) аминокислота домена $^{10}\text{Fn3}$ находящаяся в положении, соответствующем положению 94 домена $^{10}\text{Fn3}$ дикого типа, указанного в SEQ ID NO:1 непосредственно связана с остатком, состоящим из аминокислотной последовательности PmXn , где
 - (a) P представляет собой пролин и m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и
 - (b) n представляет собой целое число, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, причем каждый X независимо представляет собой любую аминокислоту, когда n равен 2 или более; и
 - (ii) фрагмент PmXn обеспечивает улучшенное свойство белка FBS относительно белка FBS, который не связан с фрагментом PmXn .
2. Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PP.
3. Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PmXn , в котором n равно от 1 до 150.
4. Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PmXn , в котором n равно от 1 до 10.
5. Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент состоит из PmXn , в котором n равно от 1 до 5.
6. Выделенный белок FBS по п.1, в котором фрагмент аминокислотной последовательности PmXn состоит из PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 61), PIEK (SEQ ID NO: 63), PIDKP (SEQ ID NO: 65), PIEKP (SEQ ID NO: 67), PIDKPS (SEQ ID NO: 69), PIEKPS (SEQ ID NO: 71), PIDKPC (SEQ ID NO: 73), PIEKPC (SEQ ID NO: 75), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83), PNNNNNN (SEQ ID NO: 87) или PCHNNNNNN (SEQ ID NO: 86).
7. Выделенный белок FBS по любому из пп. 1-6, содержащий аминокислотную последовательность $\text{LEVVAAX}_u\text{LLISW}_v\text{YRITY}_w\text{FTV}_x\text{ATISGL}_y\text{YTITVYA}_z\text{ISINYRT}$ (SEQ ID NO: 16), где $(X)_u$, $(X)_v$, $(X)_w$, $(X)_x$, $(X)_y$ и $(X)_z$ состоят из аминокислотной последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1) или содержат по меньшей мере одно отличие аминокислот от соответствующей последовательности дикого типа.
8. Выделенный белок FBS по любому из пп. 1-7, причем аминокислотная последовательность домена $^{10}\text{Fn3}$ по меньшей мере на 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.
9. Выделенный белок FBS по любому из пп. 1 и 3-8, в котором по меньшей мере один X из фрагментов PmXn представляет собой цистеин.
10. Выделенный белок FBS по п.9, в котором фрагмент PmXn представляет собой PmCXn или $\text{PmXn}_1\text{CXn}_2$, где C представляет собой цистеин, n_1 и n_2 независимо равны 0 или целому числу, равному 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более.
11. Выделенный белок FBS по п.9 или 10, в котором цистеин фрагмента PmXn конъюгирован с гетерологичным фрагментом.
12. Выделенный белок FBS по п.11, в котором гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемый фрагмент.
13. Выделенный белок FBS по п.11, в котором гетерологичная молекула представляет собой фрагмент лекарственного средства и фрагмент лекарственного средства и FBS образуют конъюгат FBS с лекарственным средством.
14. Выделенный белок FBS по любому из пп. 1-13, в котором улучшенное свойство, обеспечиваемое фрагментом PmXn , представляет собой повышенную термостабильность.
15. Выделенный белок FBS по п.14, в котором повышенная термостабильность представляет собой увеличение T_m по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5°C или более.

040085



RDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK
PGVDYITIVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
