



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/78 (2019.02); C07K 16/2875 (2019.02); A61K 38/39 (2019.02); C07K 2318/20 (2019.02); C07K 2319/21 (2019.02); C07K 2319/30 (2019.02); C07K 2319/31 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2014117511, 10.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.10.2012

Дата регистрации:
01.11.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.10.2011 US 61/546,028

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2015 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 01.11.2019 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.05.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2012/059477 (10.10.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/055745 (18.04.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КОЙЛ Энтони (US),
БАКА Мануэль (US),
ТИСТЕД Томас (US),
ДРАБИК Стейси (US),
ГРИНБЕРГ Люба (US),
НОВАРРА Шабазз (US),
ОГАНЕСЯН Вахех (US),
ХЕРБСТ Роналд (US),
СПЕНСЕР Дэвид Кеннет (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕДИММЬОН, ЭЛЭЛСИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20100298541 A1, 25.11.2010. WO
2011051466 A1, 05.05.2011. US 20100098730 A1,
22.04.2010. US 2008004206 A1, 03.01.2008. US
20090176654, 09.07.2009. RU 2407544 C2,
27.12.2010.

(54) CD40L-СПЕЦИФИЧНЫЕ КАРКАСНЫЕ СТРУКТУРЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ Tn3, И СПОСОБЫ
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к каркасным структурам на основе FnIII-домена тенацина-3 (Tn3). Изобретение позволяет получить каркасную структуру, способную специфически связываться с CD40L и обладающую повышенной аффинностью в отношении мишени в сравнении с известными аналогами. Сконструированные

каркасные структуры по настоящему изобретению могут применяться в качестве профилактических, диагностических или терапевтических средств, в частности, для терапевтических применений против SLE и других аутоиммунных заболеваний и состояний. 16 н. и 25 з.п. ф-лы, 19 ил., 10 табл., 7 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)*A61K 38/05* (2006.01)*A61K 38/17* (2006.01)*C07K 14/78* (2006.01)*C12N 15/11* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/78 (2019.02); C07K 16/2875 (2019.02); A61K 38/39 (2019.02); C07K 2318/20 (2019.02); C07K 2319/21 (2019.02); C07K 2319/30 (2019.02); C07K 2319/31 (2019.02)

(21)(22) Application: **2014117511, 10.10.2012**

(24) Effective date for property rights:
10.10.2012

Registration date:
01.11.2019

Priority:

(30) Convention priority:
11.10.2011 US 61/546,028

(43) Application published: **20.11.2015 Bull. № 32**(45) Date of publication: **01.11.2019 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **12.05.2014**

(86) PCT application:
US 2012/059477 (10.10.2012)

(87) PCT publication:
WO 2013/055745 (18.04.2013)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KOJL Entoni (US),
BAKA Manuel (US),
TISTED Tomas (US),
DRABIK Stejsi (US),
GRINBERG Lyuba (US),
NOVARRA Shabazz (US),
OGANESYAN Vakhekh (US),
KHERBST Ronald (US),
SPENSER Devid Kennet (US)**

(73) Proprietor(s):

MEDIMMYUN, ELELSI (US)

(54) **CD40L-SPECIFIC CARCASS STRUCTURES DERIVED FROM Tn3, AND METHODS FOR USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to biotechnology, specifically to framework structures based on FnIII-domain tenascin-3 (Tn3). Invention enables to obtain a framework structure capable of specifically binding CD40L and having high affinity for the target compared to known analogues.

EFFECT: constructed frame structures of the present invention can be used as preventive, diagnostic or therapeutic agents, particularly for therapeutic applications against SLE and other autoimmune diseases and conditions.

41 cl, 19 dwg, 10 tbl, 7 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка содержит объект изобретения, который частично относится к предварительной заявке США № 61/546028, поданной 11 октября 2011 года, предварительной заявке США № 61/323708, поданной 13 апреля 2010 года; международной заявке № PCT/US2011/032184, поданной 12 апреля 2011 года; международной заявке № PCT/US2011/032188, поданной 12 апреля 2011 года; и PCT заявке № PCT/US2008/012398, поданной 10 октября 2008 года и опубликованной в виде международной публикации № WO 2009/058379 A2. Каждая из вышеуказанных заявок включена в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка включает посредством ссылки перечень последовательностей, поданный с заявкой с помощью EFS-Web в виде текста, представленного под названием "CD40L-101WO1_SL.txt", созданного 3 октября 2012 года и имеющего размер 232 килобайта.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область изобретения

[0003] Настоящее изобретение в целом относится к области миметиков антител, а именно к каркасным структурам, происходящим из третьего домена фибронектина типа III тенасина С человека, пригодным, например, для создания продуктов, обладающих новыми характеристиками связывания. В частности, настоящее изобретение относится к CD40L-специфичным Tn3-каркасным структурам, способам получения подобных каркасных структур и способам применения для диагностики и лечения системной красной волчанки и других аутоиммунных и/или воспалительных нарушений.

Уровень техники

[0004] Настоящее изобретение относится к CD40L-специфичным белковым каркасным структурам, которые связываются с CD40L, пригодным, например, для лечения аутоиммунных и/или воспалительных нарушений.

[0005] Биомолекулы, способные к специфическому связыванию с желаемым целевым эпитопом, имеют большое значение в качестве терапевтических средств, научно-исследовательских и медицинских диагностических средств. Хорошо известным примером данного класса молекул является антитело. Антитела можно выбрать таким образом, чтобы они специфически связывались и являлись аффинными к практически любому структурному эпитопу. Однако, природные антитела представляют собой гетеротетрамерные, сложные по своей структуре молекулы, которые с трудом экспрессируются в простых эукариотических системах. В результате большинство антител получают с использованием сложных и дорогостоящих экспрессирующих систем на основе клеток млекопитающих.

[0006] Белки, имеющие относительно определенные трехмерные структуры, обычно называемые белковыми каркасными структурами, можно использовать в качестве реагентов для создания сконструированных продуктов. Одной специфической сферой, в которой используют подобные каркасные структуры, является область создания миметиков антител. Миметики антител, т.е., малые, не являющиеся антителами белковые терапевтические средства, обладающие преимуществами антител и фрагментов антител, такими как высокая аффинность связывания с мишенями и низкие иммуногенность и токсичность, избегают при этом некоторых недостатков, таких как склонность фрагментов антител к агрегации и меньшая стабильность, чем у полноразмерных IgG.

[0007] Данные недостатки можно устранить путем использования фрагментов антител, созданных путем удаления частей в нативной структуре антитела. Однако, это часто

вызывает агрегацию, если аминокислотные остатки, которые в норме погружены в гидрофобное окружение, такое как граница раздела между варибельным и константным доменом, подвергаются воздействию растворителя. Один пример миметика антитела на основе каркасной структуры основан на структуре домена фибронектина типа III (FnIII), домена, который широко распространен среди типов и классов белков, таких как белки крови млекопитающих и структурные белки. Конструирование и применение каркасных структур FnIII, полученных из третьего домена FnIII человеческого тенасцина С, описано в РСТ заявках РСТ/US2011/032184 и РСТ/US2011/032188, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

[0008] CD40L является представителем семейства молекул TNF, которые первично экспрессируются на активированных Т-клетках (в том числе подтипах Th0, Th1 и Th2), и образуют гомотримеры, сходные с другими представителями данного семейства. Кроме того, обнаружили, что CD40L экспрессируется на Mast-клетках и активированных базофилах и эозинофилах. CD40L связывается с рецептором CD40 (CD40R) на антиген-презентирующих клетках (APC), что приводит к различным эффектам в зависимости от типа клетки-мишени. В целом, CD40L играет роль в качестве костимулирующей молекулы и индуцирует активацию APC в ассоциации со стимуляцией Т-клеточного рецептора молекулами МНС на APC.

[0009] Передача сигнала посредством рецептора CD40 с помощью CD40L запускает каскад реакций, что приводит в результате к активации клеток, несущих рецептор CD40, и оптимальному примированию CD4+ Т-клеток. Более конкретно, когнатное взаимодействие между CD40L и рецептором CD40 стимулирует дифференциацию В-клеток в антитело-секретирующие клетки и В-клетки памяти (Burkly, In Adv. Exp. Med. Bio., Vol. 489., D. M. Monroe, U. Hedner, M. R. Hoffman, C. Negrier, G. F. Savidge, and G. C. I. White, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 135). Дополнительно, взаимодействие между CD40L и рецептором CD40 стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет посредством активации макрофагов и дендритных клеток и образования естественных клеток-киллеров, а также цитотоксических Т-лимфоцитов (смотри Burkly выше).

[0010] Было показано, что взаимодействие между CD40L и рецептором CD40 играет важную роль в нескольких экспериментально индуцированных аутоиммунных заболеваниях, таких как коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, оофорит, колит, медикаментозный волчаночный нефрит. В частности, было показано, что индукцию заболевания во всех из этих моделей можно блокировать CD40L-антагонистами во время введения антигена. Прекращение развития заболевания с использованием антитела, являющегося антагонистом к CD40L, также было показано в моделях спонтанного аутоиммунного заболевания на животных, включая формы инсулинозависимого диабета и волчаночный нефрит, а также заболевание "трансплантат против хозяина", трансплантацию, фиброз легких и модели заболевания атеросклерозом.

[0011] Было показано, что нарушение каскада реакций CD40L/CD40R посредством блокирования CD40L является благоприятным при многих аутоиммунно-опосредованных заболеваниях (например, но без ограничения, системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит (RA), рассеянный склероз (MS), воспалительные заболевания кишечника (IBD) и отторжение аллотрансплантата. Например, лечение антителами к CD40L обеспечивает предупреждение или улучшение течения нефрита в мышинной модели коллаген-индуцированного артрита (Mohan *et al.* J. Immuno. 154:1470). Кроме того, антитела к CD40L обеспечивают сохранение почечной функции у мышей

SNF1 с тяжелым нефритом. (Kalled *et al.* J. Immuno. 160:2158). Уровни CD40L тесно коррелируют с клинической тяжестью заболевания (*т.е.*, уменьшение воспаления), и повреждением ткани-мишени как у субъектов, не относящихся к людям, так и у людей.

[0012] SLE представляет собой прогрессирующее и в ряде случаев приводящее к смерти заболевание. Различные проявления волчанки варьируют от сыпи и артрита вплоть до анемии и тромбоцитопении и даже психоза. Существует явное свидетельство, демонстрирующее, что многие механизмы иммунной системы вовлечены в воспалительный процесс, приводящий к заболеваниям почек, кожи, головного мозга и тромбозу. Одним характерным признаком SLE является утрата В-клеточной толерантности и выраженность наличия аутоантител у пациентов с этим заболеванием. При волчаночном заболевании почек аутоантитела к двухцепочечной ДНК могут образовывать комплексы антитело-нуклеосома и осаждаются на почечной клубочковой базальной мембране. Данные иммунные комплексы, в свою очередь, активируют комплемент, что может привести к гломерулонефриту.

[0013] Как было выявлено, у пациентов с SLE повышена экспрессия CD40R, а также CD40L. Усиленный костимулирующий сигнал, вероятно, способствует патологическому воспалительному ответу, выявляемому при SLE. Т-клетки при SLE характеризуются спонтанным повышением активации, связанным с пониженным порогом активации на аутоантигены. Кроме того, эти клетки имеют пониженную чувствительность к дополнительной антигенной стимуляции, устойчивы к апоптозу, характеризуются увеличенной продолжительностью существования после активации и имеют множество измененных внутриклеточных сигнальных путей. После активации CD40R на APC Т-клеточными CD40L, как APC, так и Т-клетки становятся активными, продуцируют цитокины и при SLE способствуют продуцированию патогенных аутоантител и повреждению ткани (волчаночный нефрит). Блокирование сигнального пути CD40R/CD40L отдельно или в комбинации является эффективным при прекращении развития заболевания у предрасположенных к волчанке мышей. У пациентов с SLE гуманизированное антитело к CD40L приводило к уменьшению количества антител к двухцепочечной ДНК и В-клеток, протеинурии и облегчало тяжесть заболевания при SLE.

[0014] Однако, нацеленное воздействие на CD40L естественными антителами существенно повышало факторы опасности. Например, исследование с использованием антитела к CD40L 5c8 (BIOGEN®) у пациентов, страдающих от хронической резистентной идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (ITP) были приостановлены по причине зарегистрированных тромбоэмболических осложнений (Davidson *et al. Arth Rheu*, 43: S271). Кроме того, дополнительные испытания с использованием альтернативных антител, направленных против CD40L, привели к другим связанным с тромбозом осложнениям (Davis *et al. Arth Rheu*, 43:S281; Schuler, *Transplantation*, 77:717). С учетом трудностей, связанных с антагонизмом по отношению к CD40L, направляемым антителом, существует неудовлетворенная потребность в нацеленном воздействии и антагонизме по отношению к CD40L при помощи альтернативного средства, не являющегося антителом. Таким образом, направленное воздействие на CD40L при помощи каркасной структуры на основе Tn3 представляет собой эффективную альтернативу с предотвращением Fab2 и/или Fc-опосредованной агрегации тромбоцитов и последующих побочных эффектов.

[0015] Цитирование или обсуждение ссылки в данном документе не следует истолковывать как допущение того, что таковая относится к предшествующему уровню техники для настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] Настоящее изобретение предлагает Tn3-каркасную структуру, содержащую CD40L-специфичные мономерные субъединицы, где мономерная субъединица содержит семь бета-цепей, обозначенных A, B, C, D, E, F и G, и шесть петлевых участков, обозначенных AB, BC, CD, DE, EF и FG, и где Tn3-каркасная структура специфически связывается с CD40L. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, соединенные в тандем. В некоторых конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые соединены непосредственно.

[0017] В некоторых вариантах осуществления две CD40L-специфичные мономерные субъединицы соединены линкером. В других вариантах осуществления линкер содержит пептидный линкер, который может представлять собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность $(G_mX)_n$, где X представляет собой серин (S), аланин (A), глицин (G), лейцин (L), изолейцин (I) или валин (V); m и n представляют собой целые значения; m равно 1, 2, 3 или 4; и n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143.

[0018] В некоторых вариантах осуществления связывание Tn3-каркасной структуры, содержащей две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, с CD40L улучшено по сравнению с Tn3-каркасной структурой, содержащей одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу. В других вариантах осуществления связывание Tn3-каркасной структуры, содержащей две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, с CD40L обеспечивает улучшение воздействия на мишень по сравнению с Tn3-каркасной структурой, содержащей одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу. В других вариантах осуществления улучшение связывания Tn3-каркасной структуры с CD40L представляет собой улучшение аффинности связывания, улучшение авидности связывания, или и то и другое. В конкретных вариантах осуществления аффинность связывания Tn3-каркасной структуры, содержащей две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, с CD40L и стабильность белка Tn3-каркасной структуры улучшены по сравнению с Tn3-каркасной структурой, содержащей одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу. В некоторых вариантах осуществления авидность связывания Tn3-каркасной структуры, содержащей две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, по отношению к CD40L и стабильность белка Tn3-каркасной структуры улучшены по сравнению с Tn3-каркасной структурой, содержащей одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу.

[0019] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна CD40L-специфичная мономерная субъединица в Tn3-каркасной структуре связана с линкером или гетерологичным фрагментом. В других вариантах осуществления линкер или гетерологичный фрагмент в Tn3-каркасной структуре конъюгирован с N-концом или C-концом CD40L-специфичной мономерной субъединицы. В конкретных вариантах осуществления линкер, связанный с CD40L-специфичной мономерной субъединицей в Tn3-каркасной структуре, содержит пептидный линкер, который в некоторых вариантах осуществления может представлять собой гибкий пептидный линкер. Данный пептидный линкер в определенных вариантах осуществления может содержать последовательность $(G_mX)_n$, где X представляет собой серин (S), аланин (A), глицин (G), лейцин (L), изолейцин (I) или валин (V); m и n представляют собой целые числа; m равно 1, 2, 3 или 4; и n равно

1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер, связанный с CD40L-специфичной мономерной субъединицей в Tn3-каркасной структуре, содержит SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143.

5 [0020] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит линкер, который содержит функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления данная функциональная группа представляет собой иммуноглобулин или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления данный иммуноглобулин или его фрагмент содержит Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления данный Fc-домен не индуцирует по меньшей мере одну FcγR-опосредованную эффекторную
10 функцию. В некоторых вариантах осуществления данная по меньшей мере одна FcγR-опосредованная эффекторная функция представляет собой ADCC.

[0021] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу, связанную с гетерологичным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления данный
15 гетерологичный фрагмент содержит структуру, выбранную из группы, состоящей из следующего: белок, пептид, белковый домен, линкер, лекарственное средство, токсин, цитотоксическое средство, радиофармацевтическое средство, радионуклид, радиоактивное соединение, органический полимер, неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, человеческий сывороточный альбумин
20 (HSA), участок, отвечающий за связывание HSA с FcRn, антитело, домен антитела, фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, антитело на основе домена, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасная структура, отличающаяся от FnIII, эпитопная метка, рекомбинантный полипептидный полимер, цитокин и комбинация двух или более из указанных фрагментов.

25 [0022] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу, конъюгированную с PEG. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу, конъюгированную с альбумином. В конкретных вариантах осуществления данный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA). В других вариантах осуществления
30 данный HSA представляет собой вариант HSA. В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислотная последовательность варианта HSA представляет собой SEQ ID NO: 133. В других вариантах осуществления вариант HSA имеет по меньшей мере одно улучшенное свойство по сравнению с нативным HSA или фрагментом
35 нативного HSA. В конкретных вариантах осуществления улучшенное свойство представляет собой измененное время полужизни в плазме по сравнению с временем полужизни в плазме нативного HSA или фрагмента нативного HSA. В некоторых вариантах осуществления измененное время полужизни в плазме представляет собой более длительное время полужизни в плазме по сравнению с временем полужизни в
40 плазме нативного HSA или фрагмента нативного HSA. В других вариантах осуществления измененное время полужизни в плазме представляет собой более короткое время полужизни в плазме по сравнению с временем полужизни в плазме нативного HSA или фрагмента нативного HSA.

[0023] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура является
45 слитой с вариантом HSA, содержащим по меньшей мере одну аминокислотную замену в домене III HSA. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура является слитой с вариантом HSA, содержащим последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей мере одной

аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, в положении, выбранном из группы, состоящей из 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 и 580; где по меньшей мере одна аминокислотная замена не включает замену лизина (K) на глутаминовую кислоту (E) в положении 573, и где Tn3-каркасная структура имеет время полужизни в плазме больше, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, которая не является конъюгированной с таким вариантом HSA.

[0024] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура является слитой с вариантом HSA, где по меньшей мере одна аминокислотная замена, пронумерованная относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, находится в положении, выбранном из группы, состоящей из 463, 508, 523 и 524, где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, которая не является конъюгированной с указанным вариантом HSA. В некоторых вариантах осуществления вариант HSA, содержит последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из: (a) замены лейцина (L) в положении 407 на аспарагин (N) или тирозин (Y); (b) замены валина (V) в положении 415 на треонин (T); (c) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N); (d) замены лизина (K) в положении 500 на аргинин (R); (e) замены треонина (T) в положении 506 на тирозин (Y); (f) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R); (g) замены фенилаланина (F) в положении 509 на метионин (M) или триптофан (W); (h) замены аланина (A) в положении 511 на фенилаланин (F); (i) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 512 на тирозин (Y); (j) замены треонина (T) в положении 515 на глутамин (Q); (k) замены лейцина (L) в положении 516 на треонин (T) или триптофан (W); (l) замены аргинина (R) в положении 521 на триптофан (W); (m) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R); (n) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L); (o) замены глутамина (Q) в положении 526 на метионин (M); (p) замены гистидина (H) в положении 535 на пролин (P); (q) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 550 на глутаминовую кислоту (E); (r) замены лизина (K) в положении 557 на глицин (G); (s) замены лизина (K) в положении 573 на фенилаланин (F), гистидин (H), пролин (P), триптофан (W) или тирозин (Y); (t) замены лизина (K) в положении 574 на аспарагин (N); (u) замены глутамина (Q) в положении 580 на лизин (K) и (v) комбинации из двух или более указанных замен, где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни Tn3-каркасной структуры, которая не является конъюгированной с указанным вариантом HSA.

[0025] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура является слитой с вариантом HSA, содержащим последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из: (a) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N); (b) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R); (c) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R); (d) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L) и (e) комбинации из двух или более указанных замен, где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время

полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, которая не является конъюгированной с указанным вариантом HSA.

[0026] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две идентичные CD40L-специфичные мономерные субъединицы. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две различные CD40L-специфичные мономерные субъединицы. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура представляет собой агонист рецептора CD40L. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура представляет собой антагонист рецептора CD40.

[0027] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые специфически связываются с одним и тем же эпитопом CD40L. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые специфически связываются с различными эпитопами CD40L. В некоторых вариантах осуществления данные различные эпитопы CD40L представляют собой неперекрывающиеся эпитопы. В других вариантах осуществления данные различные эпитопы CD40L представляют собой перекрывающиеся эпитопы.

[0028] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура связывается по меньшей мере с двумя молекулами CD40L. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая связывается по меньшей мере с двумя молекулами CD40L.

[0029] В некоторых вариантах осуществления бета-цепи по меньшей мере одной CD40L-специфичной мономерной субъединицы из Tn3-каркасной структуры имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательности с бета-цепями с SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь А, которая содержит SEQ ID NO: 11, или содержащую бета-цепь А, которая содержит SEQ ID NO: 11, за исключением по меньшей мере одной мутации. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь В, которая содержит SEQ ID NO: 12, или содержащую бета-цепь В, которая содержит SEQ ID NO: 12, за исключением по меньшей мере одной мутации. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь С, которая содержит SEQ ID NO: 13 или 14, или содержащую бета-цепь С, которая содержит SEQ ID NO: 13 или 14, за исключением по меньшей мере одной мутации, и где цистеин в SEQ ID NO: 13 или 14 не заменен. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь D, которая содержит SEQ ID NO: 15, или содержащую бета-цепь D, которая содержит SEQ ID NO: 15, за исключением по меньшей мере одной мутации.

[0030] В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь Е, которая содержит SEQ ID NO: 16, или содержащую бета-цепь Е, которая содержит SEQ ID NO: 16, за исключением по меньшей мере одной мутации. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую бета-цепь F, которая содержит SEQ ID NO: 17, или содержащую бета-цепь F, которая содержит SEQ ID NO: 17, за исключением по меньшей мере одной мутации, и где цистеин в SEQ ID NO: 17 не заменен. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу,

содержащую бета-цепь G, которая содержит SEQ ID NO: 18, или содержащую бета-цепь G, которая содержит SEQ ID NO: 18, за исключением по меньшей мере одной мутации.

[0031] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая содержит аминокислотную

последовательность:

$IEV(X_{AB})_n ALITW(X_{BC})_n CELX_1 YGI(X_{CD})_n TTIDL(X_{DE})_n YSI(X_{EF})_n YEVS LIC(X_{FG})_n KETFTT$,

где X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG, соответственно; X_1 представляет собой аминокислотный остаток A или T; и длина петли n представляет собой целое число от 2 до 26.

[0032] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 136, последовательность петли CD содержит SEQ ID NO: 6, и последовательность петли EF содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 137. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 и 168. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли DE содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 95, 96, 97, 98 и 169. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли FG содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 99, 139 и 170.

[0033] В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 и 174. В определенных вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли DE содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 и 175. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли FG содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, 130 и 177. В определенных вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли AB содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 136.

[0034] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 83, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 94 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 9 или 139. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 83, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 94 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 99. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность

некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 113, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 125 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136.

[0042] В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 114, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 118 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В других вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 115, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 126 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 116, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 127 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 117, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 128 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136.

[0043] В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 и 146. В некоторых вариантах осуществления Тn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая содержит аминокислотную последовательность:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀A
X₁₁YSIGNLKPDTYEVSICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167),

где (a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или лейцин (L); (b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E); (c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), изолейцин (I), валин (V), фенилаланин (F) или триптофан (W); (d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A), глицин (G), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D); (e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), глутамин (Q), серин (S), аспарагиновую кислоту (D) или аспарагин (N); (f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток фенилаланин (F) или тирозин (Y); (g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I), валин (V), гистидин (H), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D); (h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), триптофан (W) или валин (V); (i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W), фенилаланин (F) или тирозин (Y); (j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), метионин (M) или гистидин (H); (k) X₁₁ представляет собой

аминокислотный остаток триптофан (W) или гистидин (H) и (l) X_{12} представляет собой аминокислотный остаток аргинин (R) или серин (S).

[0044] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 и 82.

[0045] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая содержит аминокислотную последовательность:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELEX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTDTGTYX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171),

где

(a) X_1 представляет собой аминокислотный остаток лизин (K) или глутаминовую кислоту (E);

(b) X_2 представляет собой аминокислотный остаток треонин (T) или изолейцин (I);

(c) X_3 представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N) или аланин (A);

(d) X_4 представляет собой аминокислотный остаток серин (S), лейцин (L), аланин (A), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(e) X_5 представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), аланин (A), глицин (G), валин (V), изолейцин (I) или серин (S);

(f) X_6 представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), серин (S), аланин (A) или гистидин (H);

(g) X_7 представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D), гистидин (H) или тирозин (Y);

(h) X_8 представляет собой аминокислотный остаток лейцин (L), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(i) X_9 представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), пролин (P), серин (S), лейцин (L) или аспарагиновую кислоту (D);

(j) X_{10} представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(k) X_{11} представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T);

(l) X_{12} представляет собой аминокислотный остаток серин (S), аспарагин (N), глутаминовую кислоту (E), аспарагин (R) или аспарагиновую кислоту (D);

(m) X_{13} представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), треонин (T), аспарагин (N) или аланин (A);

(n) X_{14} представляет собой аминокислотный остаток пролин (P), валин (V), изолейцин (I) или аланин (A) или не является аминокислотой;

(o) X_{15} представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I) или не является аминокислотой;

(p) X_{16} представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E) или лизин (K); и

(q) X_{17} представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или аспарагин (N).

[0046] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 134, 135, 205, 206, 207 и 208. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 134, 135, 205, 206, 207 и 208.

[0047] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 202, 203 и 204. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 201, 202, 203 и 204. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где указанная специфичность по отношению к CD40L относится к CD40L человека. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, где указанная специфичность по отношению к CD40L относится к мембраносвязанному CD40L (SEQ ID NO: 1), растворимому CD40L (SEQ ID NO: 2) или его фрагменту. В некоторых конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасная структура связывается с CD40L и предупреждает связывание CD40L с CD40.

[0048] Настоящее изобретение также предлагает способ изменения активности в клетке, экспрессирующей CD40L, включающий приведение в контакт клетки с Tn3-каркасной структурой, где Tn3-каркасная структура связывается с CD40L и предупреждает связывание CD40L с CD40. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура связывается с CD40L с аффинностью (K_d) приблизительно 1 мкМ или менее, или приблизительно 500 нМ или менее, или приблизительно 100 нМ или менее, или приблизительно 50 нМ или менее, или приблизительно 25 нМ или менее, или приблизительно 10 нМ или менее, или приблизительно 5 нМ или менее, или приблизительно 2 нМ или менее.

[0049] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая специфично связывается с эпитопом CD40L, содержащим аминокислоты, расположенные в положениях 142-155, 200-230 или 247-251 в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая взаимодействует с аминокислотами CD40L E142, Y146, M148, N151, L155, R200, R203 и E230. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая взаимодействует с аминокислотами CD40L R203, I204, V247, H249 и T251. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая взаимодействует с аминокислотами CD40L E142, Y146, M148, N151, L155, которые расположены в первой молекуле CD40L, и с аминокислотами CD40L R200, R203 и E230, которые расположены во второй молекуле CD40L. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, которая взаимодействует с аминокислотами CD40L R203 и I204, которые расположены в первой молекуле CD40L, и с аминокислотами CD40L V247, H249 и T251, которые расположены во второй молекуле CD40L.

[0050] Настоящее изобретение также предлагает полипептиды, содержащие один или несколько CD40L-специфичных Tn3-мономеров, включая, но без ограничения, слияния сывороточного альбумина, описанные в данном документе.

[0051] Настоящее изобретение также предлагает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру, вектор

экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру, и клетку-хозяина, содержащую такой вектор. Настоящее изобретение также предлагает способ получения Tn3-каркасной структуры, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых экспрессируется CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты.

[0052] Настоящее изобретение также предлагает фармацевтическую композицию, содержащую CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру и фармацевтически приемлемый наполнитель. Настоящее изобретение также предлагает способ предупреждения, лечения, уменьшения интенсивности, управления течением аутоиммунного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру.

[0053] Настоящее изобретение также предлагает способ снижения частоты или количества кортикостероидов, вводимых пациенту с аутоиммунным заболеванием, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру.

[0054] Аутоиммунным заболеванием, которое подлежит лечению путем введения CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры, может быть очаговая алопеция, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунная болезнь Аддисона, аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный оофорит и орхит, синдром Шегрена, псориаз, атеросклероз, диабетическая и другие ретинопатии, ретролентальная фиброплазия, возрастная макулярная дегенерация, неоваскулярная глаукома, гемангиомы, тиреоидные гиперплазии (в том числе болезнь Грейвса), трансплантация ткани роговицы и другой ткани, а также хроническое воспаление, сепсис, ревматоидный артрит, перитонит, болезнь Крона, реперфузионное повреждение, септицемия, эндотоксический шок, муковисцидоз, эндокардит, псориаз, артрит (например, псориатический артрит), анафилактический шок, ишемия органа, реперфузионное повреждение, повреждение спинного мозга и отторжение аллотрансплантата, аутоиммунная тромбоцитопения, болезнь Бехчета, булезный пемфигоид, кардиомиопатия, дерматит, связанный с целиакией спру, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, CREST-синдром, болезнь холодовых агглютининов, болезнь Крона, дискоидная волчанка, идиопатическая криоглобулинемия смешанного типа, фибромиалгия-фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический фиброз легких, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), IgA-нейропатия, болезнь Стилла, красный плоский лишай, красная волчанка, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа или иммуноопосредованный, миастения, вульгарный пемфигус, пернициозная анемия, нодозный полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическая полимиалгия, полимиозит и дерматомиозит, первичная агаммаглобулинемия, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, болезнь Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системная красная волчанка, красная волчанка, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, васкулит, такой

как герпетиформный дерматит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

[0055] В некоторых конкретных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание, которое подлежит лечению путем введения CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры, представляет собой системную красную волчанку (SLE).

[0056] Кроме того, способы лечения с помощью CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры могут предусматривать дополнительную терапию, такую как иммунотерапия, биологическая терапия, химиотерапия, лучевая терапия или терапия с помощью низкомолекулярного лекарственного средства.

[0057] Настоящее изобретение также предлагает белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 20, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с $P2_12_12_1$ -орторомбической пространственной группой и постоянными решетки, $\pm 0,1\%$, $a=85,69 \text{ \AA}$, $b=90,64 \text{ \AA}$, $c=95,56 \text{ \AA}$. В некоторых вариантах осуществления асимметрическая единица кристалла включает тример CD40L и три молекулы Tn3-каркасной структуры. В других вариантах осуществления кристалл характеризуется рассеиванием рентгеновского излучения при определении структурных координат до разрешения со значением, равным $3,2 \text{ \AA}$ или менее.

[0058] Настоящее изобретение также предлагает белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 68, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с $P2_13$ -кубической пространственной группой и постоянными решетки, $\pm 0,1\%$, $a=b=c=97,62 \text{ \AA}$. В некоторых вариантах осуществления асимметрическая единица кристалла содержит одну молекулу CD40L и одну молекулу Tn3-каркасной структуры. В других вариантах осуществления кристалл характеризуется рассеиванием рентгеновского излучения при определении структурных координат до разрешения со значением, равным $2,7 \text{ \AA}$ или менее.

[0059] Настоящее изобретение также предлагает белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 28 или 146, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с $P321$ -пространственной группой и постоянными решетки, $\pm 0,1\%$, $a=95,53 \text{ \AA}$, $b=93,53 \text{ \AA}$, $c=66,69 \text{ \AA}$. В некоторых вариантах осуществления асимметрическая единица кристалла содержит одну молекулу CD40L и одну молекулу Tn3-каркасной структуры. В других вариантах осуществления кристалл характеризуется рассеиванием рентгеновского излучения при определении структурных координат до разрешения со значением, равным $2,8 \text{ \AA}$ или менее.

[0060] Настоящее изобретение также предлагает белковый кристалл, содержащий две различные Tn3-каркасные структуры, состоящие из SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 28 или 146, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с $P2_1$ -кубической пространственной группой и постоянными решетки, $\pm 0,1\%$, $a=80,32 \text{ \AA}$, $b=143,48 \text{ \AA}$, $c=111,27 \text{ \AA}$, $\beta=98,22 \text{ \AA}$. В некоторых вариантах осуществления асимметрическая единица кристалла содержит два тримера CD40L и шесть молекул каждой Tn3-каркасной структуры. В других вариантах осуществления кристалл характеризуется рассеиванием рентгеновского излучения при определении структурных координат до разрешения со значением, равным $1,9 \text{ \AA}$ или менее.

[0061] В некоторых вариантах осуществления белковый кристалл получают с использованием диффузии паров в сидячей капле. Настоящее изобретение также предлагает способ получения белкового кристалла, предусматривающий: (а) смешивание

объема раствора, содержащего Tn3-каркасную структуру, которая содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, в комплексе с CD40L, с объемом резервуарного раствора, содержащего осаждающее средство; и (b) инкубирование смеси, полученной на этапе (a) в закрытом контейнере в пригодных для кристаллизации условиях до образования белкового кристалла. В некоторых вариантах осуществления способ получения белкового кристалла предусматривает применение диффузии паров в сидячей капле.

[0062] В некоторых вариантах осуществления способ создания белкового кристалла применяют для получения кристаллов, содержащих CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы с SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 146.

[0063] Настоящее изобретение также предлагает машиночитаемый накопитель данных, содержащий материал для хранения данных, закодированный машиночитаемыми командами для: (a) преобразования данных в графическое трехмерное изображение структуры части белкового кристалла Tn3-каркасной структуры, содержащей CD40L-специфичную мономерную субъединицу, образующую комплекс с CD40L; и (b) обеспечения отображения указанного графического трехмерного изображения. В некоторых вариантах осуществления такая Tn3-каркасная структура содержит SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 146. В других вариантах осуществления такой белковый кристалл представляет собой

[0064] (a) белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 20, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с P2₁2₁2₁-орторомбической пространственной группой и постоянными решетки, +/- 0,1%, a=85,69 Å, b=90,64 Å, c=95,56 Å;

[0065] (b) белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 68, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с P2₁3-кубической пространственной группой и постоянными решетки, +/- 0,1%, a=b=c=97,62 Å; или

[0066] (c) белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 20, и Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 68, где обе Tn3-каркасные структуры находятся в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2);

[0067] (d) белковый кристалл, содержащий Tn3-каркасную структуру, состоящую из SEQ ID NO: 28 или 146, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с P321-пространственной группой и постоянными решетки, +/- 0,1%, a=95,53 Å, b=93,53 Å, c=66,69 Å;

[0068] (e) белковый кристалл, содержащий две различные Tn3-каркасные структуры, состоящие из SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 28 или 146, в комплексе с растворимым CD40L (SEQ ID NO: 2), где данный кристалл имеет кристаллическую решетку с P2₁-кубической пространственной группой и постоянными решетки, +/- 0,1%, a=80,32 Å, b=143,48 Å, c=111,27 Å, β=98,22 Å.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0069] С целью иллюстрации настоящего изобретения в графических материалах изображены определенные варианты осуществления настоящего изобретения. Тем не менее, настоящее изобретение не ограничено точными структурами и средствами из вариантов осуществления, изображенных на графических материалах.

[0070] На Фиг. 1А показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована мышинным CD40L (MuCD40L), измеренное с помощью анализа D10G4.1/PBMC

(моноклеарные клетки периферической крови). Анализировали мышиную CD40L-специфичную Tn3-каркасную структуру M13, ее вариант M31 с оптимизированной аффинностью (приблизительно 20x улучшение аффинности), моноклональное антитело MR1 к CD40L, а также негативный контроль. Также показаны значения IC₅₀.

[0071] На Фиг. 1В показано ингибирование CD40L в анализе с мышиным NfκB. В данном анализе используют NIH3T-клетки, экспрессирующие мышиный CD40R и содержащие репортерный конструктор NfκB-люцифераза. Добавление CD40L приводит к возникновению сигнала (измеряется по люциферазной активности), который ингибируется как антителом MR1 к CD40L, так и CD40L-специфичной Tn3-каркасной структурой M31.

[0072] На Фиг. 2А показано конструирование конструкторов слияния CD40L-специфичных tandemных бивалентных Tn3-каркасных структур и сывороточного альбумина (SA).

[0073] На Фиг. 2В показано анализ в SDS-PAGE очищенного моновалентного конструктора M13 (CD40L-специфичный Tn3-конструктор) или tandemных бивалентных каркасных структур с линкерами, содержащими 1, 3, 5 или 7 звеньев Gly₄Ser (обозначены как GS), соединяющими две мономерные субъединицы Tn3 M13. Моновалентный конструктор M13 разгоняли на дорожке 2, димерный конструктор с 1 звеном GS (C1) разгоняли на дорожках 3 и 7, димерный конструктор с 3 звеньями GS (C2) разгоняли на дорожках 4 и 8, димерный конструктор с 5 звеньями GS (C3) разгоняли на дорожках 5 и 9, а димерный конструктор с 7 звеньями GS (C4) разгоняли на дорожках 6 и 10. Образцы разгоняли либо при невозстанавливающих условиях (дорожки 2-6), либо при восстанавливающих условиях (дорожки 7-10).

[0074] На Фиг. 2С показано конкурентное ингибирование связывания мышинного CD40L с мышиным рецептором CD40, иммобилизованном на биосенсорном чипе, под воздействием мышинных CD40L-специфичных моновалентных (M13) или бивалентных tandemных каркасных структур (M13-xGS-M13, где x составляет 1, 3, 5 или 7, соответствующих бивалентным каркасным структурам с линкерами, содержащими 1, 3, 5 или 7 звеньев Gly₄Ser). Также указана полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) для различных конструкторов.

[0075] На Фиг. 2D показан ингибирующий эффект мышинных CD40L-специфичных Tn3 моновалентных (M13) и бивалентных tandemных каркасных структур на экспрессию CD86, которая индуцирована мышинными CD40L, в В-клетках. Приведены значения IC₅₀ для всех Tn3-конструкторов и для антитела MR1 к мышинному CD40L.

[0076] На Фиг. 3А показаны высокие уровни экспрессии мышинной CD40L-специфичной tandemной бивалентной Tn3-каркасной структуры, слитой с мышинным сывороточным альбумином (MSA), в клетках HEK 293. Данные конструкторы имеют 1 (G₄S) повтор в линкере между звеньями Tn3-каркасной структуры и 3 (G₄S) повторами в линкере между Tn3-каркасной структурой и MSA. Кроме того, данный конструктор содержит мутацию N49Q в каждой из каркасных структур M13 и M31 для удаления потенциального сайта N-связанного гликозилирования. 10 мкл культурального супернатанта, отобранного 3 или 6 дней спустя после трансфекции, разгоняли в геле в SDS-PAGE параллельно с известными количествами очищенного белка. Уровень экспрессии оценивали до 200 мг/л на 6 день после трансфекции. Очистку осуществляли с помощью IMAC с использованием C-концевой His-метки.

[0077] На Фиг. 3В показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована мышинным CD40L (MuCD40L), измеренное с помощью клеточного анализа D10G4.1/

PBMC. Анализировали CD40L-специфичную tandemную бивалентную Tn3-каркасную структуру (M13-1GS-M13), такой же конструкт, слитый с мышинным сывороточным альбумином (MSA) (M13-1GS-M13-MSA), а также моноклональное антитело MR1 к мышинному CD40L. Для всех конструктов приведены значения IC₅₀.

5 [0078] На Фиг. 3C показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована мышинным CD40L (MuCD40L), измеренное с помощью анализа D10G4.1/PBMC. Анализировали CD40L-специфичную tandemную бивалентную Tn3-каркасную структуру (M13-1GS-M13), слитую с мышинным сывороточным альбумином (MSA) (M13-1GS-M13-MSA), вариант каркасной структуры с созревшей аффинностью M13, конъюгированный с MSA (M31Mono-MSA), tandemная бивалентная каркасная структура, содержащая вариант M31 с оптимизированной аффинностью, конъюгированный с MSA (M31-1GS-M31-MSA), tandemную бивалентную каркасную структуру в качестве негативного контроля, которая не связывается с мышинным CD40L (D1-1GS-D1-MSA), а также моноклональное антитело MR1. Также приведены значения IC₅₀.

15 [0079] На Фиг. 4A показаны фармакокинетические данные по отношению к нескольким мышинным CD40L-специфичным конструктам у мышей, определенные с помощью ELISA. Для каждого конструкта указаны значения полужизни в плазме (t_{1/2}).

[0080] На Фиг. 4B показаны фармакокинетические данные для 342-HSA, специфичного по отношению к CD40L человека, и варианта 342-HSA, содержащего замену Leu в положении 463 на Asn (L463N) и замену Lys в положении 524 на Leu (K524L), у яванского макака, определенные с помощью ELISA.

[0081] На Фиг. 5A показано созревание В-клеток в зародышевых центрах (GC) в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моноклональное антитело MR1 к CD40L.

25 [0082] На Фиг. 5B показано созревание В-клеток в зародышевых центрах (GC) в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкты, полученные из M31, слитые с MSA. В качестве негативного контроля использовали бивалентный конструкт D1-D1, конъюгированный с MSA.

30 [0083] На Фиг. 5C показано созревание В-клеток на периферии (не в GC) в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкты, полученные из M31, слитые с MSA. В качестве негативного контроля использовали бивалентный конструкт D1-D1, конъюгированный с MSA.

35 [0084] На Фиг. 5D показан процент (% CD4) и число (#CD4) CD4-положительных клеток в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкты, полученные из M31, слитые с MSA, а также моноклональные антитела MR1 к CD40L. В качестве негативного контроля использовали бивалентный конструкт D1-D1, конъюгированный с MSA.

40 [0085] На Фиг. 5E показан процент (% CD44hi) и число (#CD44hi) CD44hi-положительных клеток в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкты, полученные из M31, слитые с MSA, а также моноклональные антитела MR1 к CD40L. В качестве негативного контроля использовали бивалентный конструкт D1-D1, конъюгированный с MSA.

45 [0086] На Фиг. 5F показано количество IgG к SRBC в анализе после иммунизации бараньими эритроцитами (SRBC). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкты, полученные из M31, слитые с MSA. В качестве негативного контроля использовали бивалентный конструкт D1-D1, конъюгированный с MSA.

[0087] На Фиг. 5G показаны титры IgM к KLH в модели KLH-специфичного Т-клеточно-зависимого гуморального иммунного ответа (TDAR). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкторы, полученные из 342, слитые с HSA.

[0088] На Фиг. 5H показаны титры IgG к KLH в модели KLH-специфичного Т-клеточно-зависимого гуморального иммунного ответа (TDAR). Анализировали моновалентный и бивалентный конструкторы, полученные из 342, слитые с HSA.

[0089] На Фиг. 6A показан ингибирующий эффект моновалентных мономерных Tn3-каркасных структур 309 и 311, специфичных по отношению к CD40L человека, на экспрессию CD86 человека, которая индуцирована CD40L, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1.

[0090] На Фиг. 6B показан ингибирующий эффект моновалентных мономерных Tn3-каркасных структур 309 и 311, специфичных по отношению к CD40L человека, на пролиферацию В-клеток, стимулированную CD40L человека.

[0091] На Фиг. 6C показан ингибирующий эффект моновалентных мономерных Tn3-каркасных структур 309 и 311, специфичных по отношению к CD40L человека, на количество плазматических клеток при совместном культивировании Т/В-клеток. Также с помощью FACS было показано, что Tn3-каркасная структура 309 связывается с активированными первичными Т-клетками (данные не показаны). Каркасную структуру D1 ("Neg Tn3") использовали в качестве контроля. Также в качестве контролей использовали два моноклональных антитела к CD40L, обозначенных aCD40L(RE) и aCD40L(Bio) (моноклональное антитело Biogen 5c8 к CD40L человека).

[0092] На Фиг. 7A показано, что моновалентные Tn3-каркасные структуры 309 и 311, специфичные по отношению к CD40L человека, имеют сходные биофизические характеристики. Обе каркасные структуры являются монодисперсными, как определено с помощью SEC.

[0093] На Фиг. 7B показано, что моновалентные Tn3-каркасные структуры 309 и 311, специфичные по отношению к CD40L человека, имеют сходные биофизические характеристики. Обе каркасные структуры характеризуются сходной термостабильностью, так как исходная Tn3-каркасная структура (обозначена Tn3 (дикий тип) на графическом изображении), как измерено при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

[0094] На Фиг. 8A показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Анализировали моновалентные (311) и бивалентные (311_3GS и 311_7GS) Tn3-каркасные структуры, специфичные по отношению к CD40L человека. Показаны значения IC₅₀ для каждого конструктора.

[0095] На Фиг. 8B показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Анализировали моновалентные (309) и бивалентные (309_3GS и 309_7GS) Tn3-каркасные структуры, специфичные по отношению к CD40L человека, также как моноклональное антитело Biogen 5c8 к CD40L человека. Показаны значения IC₅₀ для каждого конструктора и антитела.

[0096] На Фиг. 9A показано конструирование типичной tandemной бивалентной Tn3-каркасной структуры, специфичной по отношению к CD40L человека, слитой с человеческим сывороточным альбумином (HSA). "GGGGG" (SEQ ID NO: 148) и "GGGGA" (SEQ ID NO: 149) представляют собой линкеры, альтернативные по отношению к линкерам "GGGGS" (SEQ ID NO: 147).

[0097] На Фиг. 9B показана тестовая очистка из 293F-клеток на колонке IEX. Плечевая

фракция (<10% основного пика) содержит О-гликозилированный белок, соединенный с остатками серина, присутствующими в линкерах.

[0098] На Фиг. 9C показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Анализировали бивалентную Tn3-каркасную структуру (309), специфичную по отношению к CD40L человека, такую же каркасную структуру, слитую с HSA, а также моноклональное антитело Biogen 5c8 к CD40L человека.

[0099] На Фиг. 9D показано ингибирование экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Тестировали три бивалентные (309) Tn3-каркасные структуры, специфичные по отношению к CD40L человека. Три (G₄S) повтора присутствовали в линкере между субъединицами, специфичными по отношению к CD40L человека (309 в данном примере), тогда как линкер между субъединицами 309 и HSA варьировал от 1 до 3 (G₄S) повторов. Также анализировали моноклональное антитело Biogen 5c8 к CD40L человека.

[0100] На Фиг. 10A показано влияние мутации в петлевых последовательностях в 309 (левая панель) и 311 (правая панель) на связывание CD40L. На связывание указывает усиление сигнала в анализе связывания. WT представляет собой вариант с первоначальной лидерной последовательностью (исходной Tn3-последовательностью), где BC, DE и FG означает варианты, в которых петлевую последовательность BC, DE или FG изменяли к исходной Tn3-последовательности, как представлено в тенасине С человека.

[0101] На Фиг. 10B показаны профили ингибирования панели каркасных структур с оптимизированной аффинностью, определенные по экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Мономеры из клона 309 Tn3, специфичного по отношению к CD40L человека, были оптимизированы по аффинности.

Оптимизированные по аффинности мономеры обозначены как клон 340 - клон 349. В конструкторе клон 309wtFG целая петля FG была заменена на петлю FG исходной Tn3-каркасной структуры. Также анализировали моноклональное антитело 5c8 к CD40L.

[0102] На Фиг. 10C показаны профили ингибирования, определенные по экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Показаны профиль мономера 311 Tn3, специфичного по отношению к CD40L человека, его вариант K4E, а также негативный контроль.

[0103] На Фиг. 10D показаны профили ингибирования, определенные по экспрессии CD86, которая индуцирована CD40L человека, в CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1. Показаны профили мономера 311K4E Tn3, специфичного по отношению к CD40L человека, мономера с оптимизированной аффинностью 311K4E_12, а также моноклонального антитела 5c8 к CD40L. Также представлены IC₅₀ для двух конструкторов и антитела.

[0104] На Фиг. 11A и Фиг. 11B показаны множественные выравнивания последовательностей исходной CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры 309, варианта 309FGwt, а также вариантов 340-349 с оптимизированной аффинностью. Аминокислотные остатки 1-42 показаны на Фиг. 11A, а аминокислотные остатки 43-83 показаны на Фиг. 11B. Варианты петель затемнены. Консенсусная аминокислотная последовательность представлена ниже множественного выравнивания последовательностей. Выровненные последовательности соответствуют

аминокислотным последовательностям клонов 309 Tn3-каркасной структуры (SEQ ID NO: 20), 309FGwt (SEQ ID NO: 22), 340 (SEQ ID NO: 24), 341 (SEQ ID NO: 26), 342 (SEQ ID NO: 28), 343 (SEQ ID NO: 30), 344 (SEQ ID NO: 32), 345 (SEQ ID NO: 34), 346 (SEQ ID NO: 36), 347 (SEQ ID NO: 38), 348 (SEQ ID NO: 40) и 349 (SEQ ID NO: 42).

5 [0105] На Фиг. 12А и Фиг. 12В показаны множественные выравнивания последовательностей исходной CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры 311, варианта 311K4E, а также вариантов 311K4E_1 - 311K4E_21 с оптимизированной аффинностью. Аминокислотные остатки 1-44 показаны на Фиг. 12А, а аминокислотные остатки 45-87 показаны на Фиг. 12В. Варианты петель затемнены. Аминокислотные
10 вариации вне затемненных петель помещены в рамку. Консенсусная последовательность представлена ниже множественного выравнивания последовательностей. Выровненные последовательности соответствуют аминокислотным последовательностям клонов 311 Tn3-каркасной структуры (SEQ ID NO: 44), 311K4E (SEQ ID NO: 46), 311K4E_1 (SEQ ID NO: 48), 311K4E_2 (SEQ ID NO: 50), 311K4E_2 (SEQ ID NO: 52), 311K4E_3 (SEQ ID NO: 54), 311K4E_4 (SEQ ID NO: 56), 311K4E_5 (SEQ ID NO: 58), 311K4E_7 (SEQ ID NO: 60),
15 311K4E_8 (SEQ ID NO: 62), 311K4E_9 (SEQ ID NO: 64), 311K4E_10 (SEQ ID NO: 66), 311K4E_11 (SEQ ID NO: 68), 311K4E_12 (SEQ ID NO: 70), 311K4E_13 (SEQ ID NO: 72), 311K4E_14 (SEQ ID NO: 74), 311K4E_15 (SEQ ID NO: 76), 311K4E_16 (SEQ ID NO: 78), 311K4E_19 (SEQ ID NO: 80), 311K4E_20 (SEQ ID NO: 82) и 311K4E_21 (SEQ ID NO: 84).

20 [0106] На Фиг. 13 показан анализ ингибирования NfκB человека, в котором используют клетки HEK293, экспрессирующие рецептор CD40 человека и содержащие репортерный конструкт NfκB-люцифераза. Добавление CD40L человека приводит к возникновению сигнала (измеряется по люциферазной активности), который ингибируется молекулой, связывающей CD40L. Анализировали CD40L-специфичные
25 каркасные структуры 340 и 342 из Tn3, а также моноклональное антитело 5с8 к CD40L.

[0107] На Фиг. 14 показано связывание Tn3-каркасных структур, специфичных по отношению CD40L человека, с CD4+ Т-клетками человека, активированными антителом к CD3/28 в течение 24 ч. Анализировали моновалентную каркасную структуру 342, слитую с HSA (обозначена 342-HSA) и бивалентную каркасную структуру 342, слитую
30 с HSA (342-342-HSA).

[0108] На Фиг. 15 показано ингибирование первичной Т/В-клеточной пролиферации у человека в день 3. Анализировали моновалентную каркасную структуру 340, слитую с HSA (340-HSA), моновалентную каркасную структуру 342, слитую с HSA (342-HSA), а также бивалентную каркасную структуру 342, слитую с HSA (342-342-HSA). Показаны
35 значения IC₅₀ для каждого конструкта.

[0109] На Фиг. 16А показан агрегационный анализ с использованием отмытых тромбоцитов. На графике показан иллюстративный позитивный контроль ADP-индуцированной агрегации для донора (три верхних записанных кривых, соответственно) ADP: 0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ вместе с иммунным комплексом (IC) из
40 моноклонального антитела 5с8 (600 нМ) и растворимого CD40L человека (200 нМ).

[0110] На Фиг. 16В показан агрегационный анализ с использованием отмытых тромбоцитов. На графике показан недостаток агрегации, если использовали преформированные иммунные комплексы из бивалентных каркасных структур 309-309 (не являются слитыми с HSA) и растворимого CD40L человека. Концентрацию
45 CD40L человека (растворимая форма) поддерживали постоянной при 600 нМ, а концентрацию конструктов каркасных структур изменяли от 200 нМ до 800 нМ.

[0111] На Фиг. 16С показан агрегационный анализ с использованием отмытых тромбоцитов. На графике показан недостаток агрегации при использовании

преформированных иммунных комплексов из моновалентных каркасных структур 342, слитых с HSA, и растворимого CD40L человека. Концентрацию CD40L человека (растворимая форма) поддерживали постоянной при 600 нМ, а концентрацию конструкторов каркасных структур изменяли от 100 нМ до 400 нМ. На графике также показана быстрая агрегация, индуцированная иммунным комплексом из моноклонального антитела Biogen 5с8 и растворимого CD40L человека.

[0112] На Фиг. 17А показано ленточное представление кристаллической структуры растворимого CD40L в комплексе с CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структурой 309. CD40L образует тример (полипептиды А, В и С). Каждая каркасная структура 309 (полипептиды D, Е и F обведены кругом) осуществляет контакт с двумя полипептидами CD40L. Перечислены специфичные контакты между мономерной каркасной структурой 309 и первым и вторым полипептидами CD40L. Это вид "сверху вниз" данной структуры.

[0113] На Фиг. 17В показано ленточное представление кристаллической структуры растворимого CD40L в комплексе с CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структурой 311K4E_12. CD40L образует тример (полипептиды А, В и С). Каждая мономерная каркасная структура 311K4E_12 (полипептиды D, Е и F обведены кругом) осуществляет контакт с двумя полипептидами CD40L. Перечислены специфичные контакты между каждой мономерной каркасной структурой 311K4E_12 и первым и вторым полипептидами CD40L. Это вид "сверху вниз" данной структуры.

[0114] На Фиг. 17С показано ленточное представление, которое демонстрирует, что каркасные структуры 311K4E_12 и 309 (обведены кругом) связываются с различными эпитопами, расположенными в различных частях тримерного комплекса CD40L. Обе каркасные структуры связываются в одном и том же кармане для того, чтобы взаимодействовать с рецептором CD40. Это "вид сбоку" данной структуры.

[0115] На Фиг. 17D показано ленточное представление структуры кристалла растворимого CD40L в комплексе с CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структурой 342. Показаны лишь один CD40L и одна мономерная каркасная структура 342. Перечислены специфичные контакты между мономерной каркасной структурой 342 и первыми полипептидами CD40L.

[0116] На Фиг. 17Е показано ленточное представление, которое демонстрирует, что каркасные структуры 342 и 311K4E_12 могут одновременно связываться с различными эпитопами, расположенными в различных частях тримерного комплекса CD40L. Обе каркасные структуры связываются в одной и той же бороздке, которая будет взаимодействовать с рецептором CD40. Это "вид сбоку" данной структуры.

[0117] На Фиг. 18А показано расположение контактов между аминокислотами в CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структуре 311K4E_12 (SEQ ID NO: 68) и тримером, образованным растворимой молекулой CD40L (SEQ ID NO: 2), как показано на Фиг. 17А. Каждая каркасная структура осуществляет контакт с 2 молекулами CD40L. Показана последовательность CD40L (SEQ ID NO: 2). Пунктирная подчеркивающая линия = цитоплазматический домен; сплошная подчеркивающая линия = сигнальный якорный мембранный белок типа II; двойная подчеркивающая линия = область, совместно кристаллизованная с Tn3-каркасной структурой; затемнение = остатки на 1-м CD40L, которые контактируют с Tn3; ненасыщенное затемнение = остатки на 2-м CD40L, которые контактируют с Tn3.

[0118] На Фиг. 18В показано расположение контактов между аминокислотами CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структуры 309 и тримера CD40L, как показано на Фиг. 17В. Каждая каркасная структура осуществляет контакт с 2 молекулами CD40L.

Показана последовательность CD40L (SEQ ID NO: 2). Пунктирная подчеркивающая линия = цитоплазматический домен; сплошная подчеркивающая линия = сигнальный якорный мембранный белок типа II; двойная подчеркивающая линия = область, совместно кристаллизованная с Tn3-каркасной структурой; затемнение = остатки на 1-м CD40L, которые контактируют с Tn3; ненасыщенное затемнение = остатки на 2-м CD40L, которые контактируют с Tn3; остатки в двойной рамке контактируют с петлей FG из каркасной структуры 309, которая, по всей видимости, не является консервативной в клонах, имеющих петлю FG дикого типа.

[0119] Фиг. 19. На панели А показана иллюстративная хроматограмма элюирования Tn3-каркасной структуры (309 или 311K4E_12), CD40L и комплекса между ними в колонке для гель-хроматографии Superdex 200 10/300 GL. На панели В показаны кристаллы комплекса 309-CD40L. Кристаллы демонстрируют увеличение размеров до $0,15 \times 0,15 \times 0,1$ мм. На панели С показаны кристаллы комплекса 311K4E_12-CD40L.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0120] Прежде чем продолжить описание настоящего изобретения более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или стадиями процесса, поскольку таковые могут изменяться. Следует отметить, что употребляемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Выражения “один или несколько” и “по меньшей мере один” могут употребляться в данном документе взаимозаменяемо.

[0121] Кроме того, выражение “и/или” там, где оно употребляется в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, выражение “и/или” при употреблении в данном документе в такой фразе, как “А и/или В”, должно включать “А и В”, “А или В”, “А” (отдельно) и “В” (отдельно). Аналогично, выражение “и/или”, при употреблении в такой фразе, как “А, В и/или С” должно охватывать каждый из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0122] Если не определено иначе, все технические и научные выражения, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист с обычной квалификацией в области техники, к которой относится это раскрытие. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих выражений, используемых в настоящем изобретении.

[0123] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, принятой в Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от аминок к карбокси. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты или варианты осуществления настоящего раскрытия, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом.

Соответственно, выражения, которые приведены непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание во всей его полноте.

[0124] Ясно, что какие бы варианты осуществления ни описывались в данном документе формулировкой “содержащий”, другие аналогичные варианты осуществления,

описываемые выражениями "состоящий из" и/или "практически состоящий из", также представлены.

[0125] В данном документе аминокислоты указаны либо с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды

[0126] Выражение "эпитоп", как используется в данном документе, относится к белковой детерминанте, способной связываться с каркасной структурой по настоящему изобретению. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первым, но не с последним теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

[0127] Выражения "домен фибронектина типа III (FnIII)," "FnIII-домен" и "FnIII-каркасная структура" относятся к полипептидам, гомологичным домену фибронектина типа III, имеющим по меньшей мере 7 бета-цепей, которые расположены между двумя бета-складчатыми слоями, которые сами по себе упакованы между собой с образованием кора белка, и дополнительно содержащим доступные для растворителя петли, соединяющие бета-цепи друг с другом. Имеется по меньшей мере три таких петли на каждом краю бета-складчатого сэндвича, где край представляет собой границу белка, перпендикулярную направлению бета-цепей. В конкретных вариантах осуществления FnIII-домен содержит 7 бета-цепей, обозначенных A, B, C, D, E, F и G, соединенных с шестью петлевыми участками, обозначенными AB, BC, CD, DE, EF и FG, где петлевой участок соединен с каждой бета-цепью.

[0128] Выражение "Tn3-каркасная структура", как используется в данном документе, относится к молекулам, содержащим по меньшей мере одну FnIII-каркасную структуру, где бета-цепь A содержит SEQ ID NO: 11, бета-цепь B содержит SEQ ID NO: 12, бета-цепь C содержит SEQ ID NO: 13 или 14, бета-цепь D содержит SEQ ID NO: 15, бета-цепь E содержит SEQ ID NO: 16, бета-цепь F содержит SEQ ID NO: 17, и бета-цепь G содержит SEQ ID NO: 18, где по меньшей мере одна петля представляет собой не встречающийся в природе вариант петель в "исходной Tn3-каркасной структуре." В конкретных вариантах осуществления одна или несколько бета-цепей Tn3-модуля включают по меньшей мере одну аминокислотную замену, за исключением того, что остатки цистеина в бета-цепи C (например, цистеин в SEQ ID NO: 13 или 14) и бета-цепях F (SEQ ID NO: 17) не заменены.

[0129] Выражение "исходный Tn3", как используется в данном документе, относится к FnIII-каркасной структуре, содержащей SEQ ID NO: 3, т.е. термально стабилизированная и созданная по методике цистеиновой инженерии FnIII-каркасная структура, полученная из 3-го FnIII-домена тенасцина C человека.

[0130] Выражения "мультимер" или "мультимерная каркасная структура" относятся к молекуле, которая содержит по меньшей мере две FnIII-каркасные структуры в комплексе. Каркасные структуры, образующие мультимерную каркасную структуру могут быть соединены посредством линкера, что позволяет каждой каркасной структуре функционировать независимо.

[0131] Выражения "мономер", "мономерная субъединица" или "мономерная каркасная структура" относятся к молекуле, которая содержит только одну FnIII-каркасную структуру.

[0132] Выражение "CD40L-специфичная мономерная субъединица", как используется в данном документе, относится к Tn3-мономеру, происходящему из "исходного Tn3", где Tn3-мономер специфически связывается с CD40L или его фрагментом, например, растворимой формой CD40L.

[0133] Выражение "ДНК" относится к последовательности из двух или более ковалентно связанных, встречающихся в природе или модифицированных дезоксирибонуклеотидов.

[0134] Выражение "белок слияния" относится к белку, который содержит в своем составе (i) одну или несколько каркасных структур по настоящему изобретению, соединенных со (ii) вторым отличным белком (т.е. "гетерологичный" белок).

Таблица 1. Последовательности и SEQ ID NO компонентов "исходной Tn3"

Название/Краткое описание	Последовательность	SEQ ID NO
Tn3	IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELT YGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLK PDTEYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT (цис-остатки дисульфидной связи подчеркнуты)	3
3-ий FnIII из тенасцина C, петля AB (Tn3)	KDVTDTT	4
3-ий FnIII из тенасцина C, петля BC (Tn3)	FKPLAEIDG	5
3-ий FnIII из тенасцина C, петля CD (Tn3)	KDVPGDR	6
3-ий FnIII из тенасцина C, петля DE (Tn3)	TEDENQ	7
3-ий FnIII из тенасцина C, петля EF (Tn3)	GNLKPDE	8
3-ий FnIII из тенасцина C, петля FG (Tn3)	RRGDMSSNPA	9
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь A (Tn3)	RLDAPSQIEV	10
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь A (Tn3) N-концевое усечение	IEV	11
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь B (Tn3)	ALITW	12
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь C (вариант Tn3)	CELAYGI	13
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь C (Tn3)	CELTGYI	14
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь D (Tn3)	TTIDL	15
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь E (Tn3)	YSI	16
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь F (Tn3)	YEVSLIC	17
3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь G (Tn3)	KETFTT	18

[0135] Выражение "гетерологичный фрагмент" используют в данном документе для указания добавления структуры к Tn3-каркасной структуре по настоящему изобретению, где структура, как правило, не является частью FnIII-домена. Иллюстративные гетерологичные фрагменты включают белки, пептиды, белковые домены, линкеры, лекарственные средства, токсины, радиофармацевтические средства, радиоактивные соединения, органические и неорганические полимеры, а также любые другие структуры, которые могут обеспечивать активность, не свойственную FnIII-домену самому по себе, в том числе, но без ограничения, полиэтиленгликоль (PEG), цитотоксическое средство, радионуклид, радиофармацевтическое средство, биотин, домен димеризации (например, домен "лейциновая застежка"), человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его часть, отвечающая за связывание с FcRn, домен или фрагмент антитела (например, переменный домен антитела, CH1-домен, Ссаппа-домен, Слямбда-домен, CH2- или CH3-домен), одноцепочечное антитело, антитело на основе домена, альбумин-связывающий домен, молекула IgG, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасная структура, отличающаяся от FnIII, эпитопная метка, полимер на основе

рекомбинантного полипептида, цитокин и тому подобные.

[0136] Выражение "линкер", как используется в данном документе, относится к любому молекулярному ансамблю, который объединяет или соединяет две или более каркасные структуры. Линкер может быть молекулой, которая функционирует в качестве "спейсера" между модулями в каркасной структуре, или также может быть молекулой с дополнительной функцией (т.е. "функциональный фрагмент"). Молекула, включенная в определение "гетерологичного фрагмента", также может функционировать в качестве линкера.

[0137] Выражения "соединенный" и "слитый" используют взаимозаменямо. Данные выражения относятся к объединению двух или более каркасных структур, гетерологичных фрагментов или линкеров с помощью любых средств, включающих химическое конъюгирование или рекомбинантные способы.

[0138] Выражения "домен" или "белковый домен" относятся к участку белка, который могут укладываться в стабильную трехмерную структуру, часто независимо от остальной части белка, и которые могут быть наделены конкретной функцией. Данная структура обеспечивает определенную функцию, ассоциированную с функцией домена в пределах первоначального белка, например, ферментативная активность, образование узнающего мотива для другой молекулы или обеспечение необходимыми структурными компонентами белка для его существования в конкретной среде белков. В пределах как семейства белков, так и суперсемейств родственных белков белковые домены могут представлять собой эволюционно консервативные области. При описании компонентов мультимерной каркасной структуры выражения "домен", "мономерная каркасная структура", "мономерная субъединица" и "модуль" можно использовать взаимозаменямо. Под "нативным FnIII-доменом" подразумевают любой нерекомбинантный FnIII-домен, который закодирован в живом организме.

[0139] "Последовательность белка" или "аминокислотная последовательность" означает линейное представление аминокислотных составляющих элементов в полипептиде в направлении от amino-конца до карбокси-конца, в котором остатки, которые граничат друг с другом в представлении являются смежными в первичной структуре полипептида.

[0140] Выражение "нуклеиновая кислота" относится к любым двум или более ковалентно связанным нуклеотидам, или аналогам нуклеотидов, или производным. Как используется в данном документе, данное выражение без ограничения включает ДНК, РНК и ПНК. "Нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" используют в данном документе взаимозаменямо.

[0141] Выражение "полинуклеотид" предназначено для охвата единичной нуклеиновой кислоты, а также множественных нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкту, например, информационной РНК (иРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Выражение "выделенная" нуклеиновая кислота или полинуклеотид относится к молекуле нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которую удалили из ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий, к примеру, каркасную структуру по настоящему изобретению, входящий в состав вектора, считают выделенным для целей настоящего изобретения.

Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или в значительной степени) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты полинуклеотидов по настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в

соответствии с настоящим изобретением дополнительно включают такие молекулы, полученные синтетически. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут представлять собой или иметь в своем составе регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

5 [0142] Выражение "фармацевтически приемлемый" относится к соединению или белку, которое можно вводить животному (например, млекопитающему) без существенных нежелательных медицинских последствий.

[0143] Выражение "физиологически приемлемый носитель" относится к носителю, который не характеризуется существенным вредным воздействием на хозяина,
10 подлежащего обработке, и который сохраняет терапевтические свойства соединения, с которым его вводят. Одним иллюстративным физиологически приемлемым носителем является физиологический солевой раствор. Другие физиологически приемлемые носители и их составы, известные специалисту в данной области техники, и описанные, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack
15 Publishing Company, Easton, Pa., включены в данный документ посредством ссылки.

[0144] Под "полипептидом" подразумевают любую последовательность из двух или более аминокислот, линейно связанных амидными связями (пептидными связями), вне зависимости от длины, посттрансляционной модификации или функции. "Полипептид", "пептид" и "белок" используют в данном документе взаимозаменяемо. Таким образом,
20 пептиды, дипептиды, трипептиды или олигопептиды включены в определение "полипептида", и выражение "полипептид" можно использовать вместо или взаимозаменяемо с любым из данных выражений. Выражение "полипептид" также предназначено для обозначения продуктов пост-экспрессионных модификаций полипептида, включая, но без ограничения, гликозилирование, ацетилирование,
25 фосфорилирование, амидирование, получение производных с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в природе аминокислот. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или создан с помощью рекомбинантной
технологии, но не обязательно осуществляется трансляция из определенной
30 последовательности нуклеиновой кислоты. Полипептид может быть получен любым способом, в том числе химическим синтезом.

[0145] Также в качестве полипептидов по настоящему изобретению предусмотрены фрагменты, производные, аналоги или варианты вышеприведенных полипептидов и
любые их комбинации. Варианты могут быть встречающимися в природе или не
35 встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить при помощи методик мутагенеза, известных в данной области техники. Варианты полипептидов могут включать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления. Также в качестве "производных" включены те пептиды, которые содержат одну или несколько встречающихся в природе аминокислотных
40 производных двадцати стандартных аминокислот.

[0146] Под "рандомизированной" или "мутированной" подразумевают включение одной или нескольких аминокислотных изменений, в том числе делеции, замены или добавления, относительно матричной последовательности. Под "рандомизированием" или "внедрением мутации" подразумевают процесс введения в последовательность
45 такого аминокислотного изменения. Рандомизация или мутация может быть достигнута посредством преднамеренного, слепого или спонтанного изменения последовательности, обычно всей кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты, и ее можно осуществить с помощью любой методики, например, ПЦР, ПЦР с использованием

ошибающейся полимеразы или химического синтеза ДНК. Выражения “рандомизирование”, “рандомизированный”, “внедрение мутации”, “мутированный” и тому подобные используют взаимозаменяемо в данном документе.

[0147] Под “когнатным” или “когнатным немутированным белком” подразумевают белок, который является идентичным по последовательности варианту белка, за исключением аминокислотных мутаций, введенных в вариант белка, где вариант белка является рандомизированным или мутированным.

[0148] Под выражением “РНК” подразумевают последовательность из двух или более ковалентно связанных, встречающихся в природе или модифицированных рибонуклеотидов. Один пример модифицированной РНК, включенный в рамки данного выражения, представляет собой фосфоротиоатную РНК.

[0149] Выражения “каркасная структура по настоящему изобретению” или “каркасные структуры по настоящему изобретению”, как используется в данном документе, относятся к мультимерным ТпЗ-каркасным структурам, а также мономерным ТпЗ-каркасным структурам. Выражение “мишень” относится к соединению, узнаваемому специфической каркасной структурой по настоящему изобретению. Выражения “мишень” и “антиген” используются взаимозаменяемо в данном документе. Выражение “специфичность”, как используется в данном документе, например, в выражениях “специфически связывается” или “специфическое связывание”, относится к относительной аффинности, при помощи которой ТпЗ-каркасная структура по настоящему изобретению связывается с одним или несколькими антигенами посредством одного или нескольких антиген-связывающих доменов, и тому, что связывание предусматривает некоторую комплементарность между одним или несколькими антиген-связывающими доменами и одним или несколькими антигенами. Согласно данному определению говорят, что ТпЗ-каркасная структура по настоящему изобретению “специфически связывается” с эпитопом, когда она связывается с данным эпитопом более легко, чем если бы она связывалась со случайным, неродственным эпитопом.

[0150] Каркасная структура со “зрелой аффинностью” представляет собой каркасную структуру с одним или несколькими изменениями, обычно в петле, результатом чего является улучшение аффинности ТпЗ-каркасной структуры по отношению к эпитопу в сравнении с исходной ТпЗ-каркасной структурой, которая не имеет такого изменения (ий).

[0151] Выражение “аффинность”, как используется в данном документе, относится к измерению силы связывания конкретной ТпЗ-каркасной структуры по настоящему изобретению с отдельным эпитопом.

[0152] Выражение “авидность”, как используется в данном документе, относится к общей стабильности комплекса между популяцией ТпЗ-каркасных структур по настоящему изобретению и определенным эпитопом, т.е функционально объединенная сила связывания множества ТпЗ-каркасных структур с антигеном. Авидность относится как к аффинности отдельных антиген-связывающих доменов в отношении конкретных эпитопов, так и также к валентности каркасной структуры по настоящему изобретению.

[0153] Выражение “воздействие на мишень” относится к связыванию ТпЗ-каркасной структуры по настоящему изобретению с одной или несколькими мишенями и к биологическим эффектам, являющимся результатом такого связывания. В этом отношении, множественные единицы, связывающие антиген, в ТпЗ-каркасной структуре могут взаимодействовать с рядом мишеней и/или эпитопов и, например, физически сближать две мишени, инициировать каскады метаболических реакций посредством взаимодействия с отдельными мишенями и т.д. В отношении CD40L, “воздействие на

мишень" относится к эффекту, достигнутому, например, путем усиления, стимуляции или активации одной или нескольких биологических активностей CD40L.

[0154] Выражение "валентность", как используется в данном документе, относится к числу потенциальных антиген-связывающих модулей, например, числу FnIII-модулей в каркасной структуре по настоящему изобретению. Если Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит более одного антиген-связывающего модуля, каждый связывающий модуль может специфически связываться с тем же эпитопом или другим эпитопом в той же мишени или других мишенях.

[0155] Выражение "дисульфидная связь", как используется в данном документе, включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиоловой группой.

[0156] Выражение "иммуноглобулин" и "антитело" включает различные широкие классы полипептидов, которые могут биохимически отличаться. Специалисты в данной области примут во внимание, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон. Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Модифицированные версии каждого из данных классов без труда различит специалист в данной области техники. Как используется в данном документе, выражение "антитело" включает, но без ограничения, интактное антитело, модифицированное антитело, VL- или VL-домен, CH1-домен, Скаппа-домен, Слямбда-домен, Fc-домен (см. ниже), CH2- или CH3-домен.

[0157] Как используется в данном документе, выражение "Fc-домен" относится к части константной области антитела. Традиционно, выражение Fc-домен относится к продукту расщепления протеазой (например, папаином), охватывающему парные CH2, CH3 и шарнирную области антитела. В контексте данного раскрытия выражение Fc-домен или Fc относится к любому полипептиду (или нуклеиновой кислоте, кодирующей такой полипептид), независимо от способа получения, который охватывает все или часть CH2, CH3 и шарнирных областей полипептида в составе иммуноглобулина.

[0158] Как используется в данном документе, выражение "модифицированное антитело" включает синтетические формы антитела, измененные таким образом, что они не являются встречающимися в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере части двух тяжелых цепей, но не две полные тяжелые цепи (как, например, антитела с удаленным доменом или минитела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные так, чтобы связываться с двумя или более антигенами или с различными эпитопами отдельного антигена. Кроме того, выражение "модифицированное антитело" включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антитела к трем или более копиям одного и того же антигена). (См., например, Antibody Engineering, Kontermann & Dubel, eds., 2010, Springer Protocols, Springer).

[0159] Выражение "время полужизни in vivo" используют в его нормальном значении, т.е. время, при котором 50% биологической активности полипептида все еще обнаруживают в теле/органе-мишени, или время, при котором активность полипептида представляет собой 50% от его исходного значения. В качестве альтернативы, к определению функционального времени полужизни in vivo, можно определить "время полужизни в сыворотке", т.е. время, при котором 50% полипептидных молекул циркулируют в плазме или кровотоке до очищения. Определение времени полужизни в сыворотке зачастую является более простым, чем определение функционального времени полужизни in vivo, и показатель времени полужизни в сыворотке обычно

является хорошим признаком показателя функционального времени полужизни. Альтернативные выражения для времени полужизни в сыворотке включают "время полужизни в плазме," время полувыведения из кровотока, время полувыведения из крови, сывороточный клиренс, плазматический клиренс и время полувыведения.

5 Функциональность, подлежащую сохранению, обычно выбирают из прокоагулянтной, протеолитической, кофактор-связывающей, рецептор-связывающей активности или другого типа биологической активности, связанной с конкретным белком.

[0160] Выражение "повышено" в отношении функционального времени полужизни *in vivo* или времени полужизни в плазме используют для указания того, что
10 относительное время полужизни полипептида представляет собой статистически значимое повышение относительно такового для контрольной молекулы (например, немодифицированный полипептид), как это определено в сопоставимых условиях.

[0161] Выражение "понижено" в отношении функционального времени полужизни *in vivo* или времени полужизни в плазме используют для указания того, что
15 относительное время полужизни полипептида представляет собой статистически значимое понижение относительно такового для контрольной молекулы (например, немодифицированный полипептид), как это определено в сопоставимых условиях.

[0162] Выражение "экспрессия", как используется в данном документе, относится к способу, с помощью которого исходя из гена продуцируется биохимическое вещество,
20 например, каркасная структура по настоящему изобретению или ее фрагмент. Способ предусматривает любое проявление функционального присутствия гена в клетке, включая, без ограничения, нокдаун гена, а также как транзистентную экспрессию, так и стабильную экспрессию. Он включает, без ограничений, транскрипцию гена в одну или несколько иРНК и трансляцию таких иРНК в один или несколько полипептидов. Если
25 конечный желаемый продукт представляет собой биохимическое вещество, экспрессия включает создание таких биохимических веществ и любых предшественников.

[0163] "Продукт экспрессии" может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например, информационную РНК, полученную посредством транскрипции гена, либо полипептид. Продукты экспрессии, описываемые в данном документе, дополнительно
30 включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами, протеолитическим расщеплением и т.п.

[0164] Выражение "вектор" или "вектор экспрессии" применяют в данном документе
35 для обозначения векторов, применяемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителей для введения в клетку и экспрессии желаемого гена в клетке-хозяине. Как известно специалистам в данной области техники, такие векторы можно без труда выбрать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. Как правило, векторы, совместимые с настоящим изобретением, как правило, будут содержать
40 селектируемый маркер, соответствующие сайты рестрикции для облегчения клонирования желаемого гена и обладать способностью проникать в эукариотические или прокариотические клетки и/или реплицироваться в них.

[0165] Выражение "клетки-хозяева" относится к клеткам, которые содержат векторы, сконструированные с помощью методик рекомбинантных ДНК и кодирующие по
45 меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения продукта экспрессии из рекомбинантных хозяев выражения "клетка" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо для указания источника продукта экспрессии, если четко не указано иное, т.е. извлечение продукта экспрессии из "клеток" означает либо

извлечение из отцентрифугированных цельных клеток, либо извлечение из культуры клеток, содержащих как среду, так и суспендированные клетки.

[0166] Выражения "лечить" или "лечение", как используются в данном документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирование воспалительного заболевания или состояния. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), либо поддающуюся, либо не поддающуюся обнаружению.

[0167] Выражение "лечение" может также означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае без получения лечения. К тем, кто нуждается в лечении, относятся те, у кого уже есть состояние или нарушение, а также те, кто склонен иметь состояние или нарушение, или те, у кого нужно предотвратить состояние или нарушение.

[0168] Выражения "субъект", "индивидуум" "животное", "пациент" или "млекопитающее" относятся к любому индивидууму, пациенту или животному, в частности, субъекту-млекопитающему, для которого необходимы диагностирование, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и зоопарковых, используемых в спорте или комнатных животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д.

[0169] Выражение "CD40L", как используется в данном документе, относится без ограничений к CD40L, экспрессированному на поверхности Т-клеток, рекомбинантно экспрессированному CD40L, CD40L, экспрессированному в E.coli и очищенному из них или других пригодных систем экспрессии рекомбинантных белков, негликозилированному CD40L и растворимым фрагментам CD40L. Как используется в данном документе, "CD40L" также относится к MegaCD40L. MegaCD40L™ представляет собой высокоактивный конструктор, в котором два тримерных CD40-лиганда искусственно соединены через коллагеновый домен домен из ACRP30/адипонектина. Данный конструктор очень эффективно стимулирует естественную мембранносвязанную агрегацию CD40L in vivo. Он обеспечивает простую и в равной степени эффективную альтернативу комбинациям [CD40L+энхансер] (Alexis biochemicals). Выражение "CD40L" относится к мономерным формам CD40L, а также к олигомерным формам, например, тримерный CD40L.

[0170] Выражение "CD40L" относится как к полноразмерному CD40L, так и к растворимым фрагментам, например, формам внеклеточного домена CD40L, возникающим в результате протеолиза. Аминокислотные последовательности мембранносвязанных и растворимых форм CD40L человека (Swissprot: P29965) показаны в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно.

[0171] Выражения "CD40L-антагонист" или "антагонист" используют в самом широком смысле, и они охватывают любую молекулу, которая частично или полностью ингибирует, снижает или инактивирует одну или несколько биологических активностей CD40L и его биологически активных вариантов in vitro, in situ или in vivo. К примеру, CD40L-антагонист может функционировать для того, чтобы частично или полностью ингибировать, снижать или инактивировать одну или несколько биологических

активностей одной или нескольких молекул CD40L или одной или нескольких молекул CD40L, связанных с CD40 или другими мишенями, *in vivo*, *in vitro* или *in situ*, как результат его связывания с CD40L.

5 [0172] Выражение “CD40L-агонист” или “агонист” используют в самом широком смысле, и оно охватывает любую молекулу, которая частично или полностью усиливает, стимулирует или активирует одну или несколько биологических активностей CD40L и его биологически активных вариантов *in vitro*, *in situ* или *in vivo*. К примеру, CD40L-агонист может функционировать для того, чтобы частично или полностью усиливать, стимулировать или активировать одну или несколько биологических активностей одной
10 или нескольких молекул CD40L или одной или нескольких молекул CD40L, связанных с CD40R или другими мишенями, *in vivo*, *in vitro* или *in situ*, как результат его связывания с CD40L.

[0173] Выражение “кристалл”, как используется в данном документе, относится к одной форме твердого состояния вещества, в которой атомы упорядочены в структуру,
15 которая периодически повторяется в трех координатах, как правило, с образованием кристаллической решетки.

[0174] Выражение “симметрия пространственной структуры”, как используется в данном документе, относится к полной симметрии кристалла, которая объединяет симметрию переноса кристаллической решетки с симметрией точечной группы.
20 “Пространственная группа” обозначается заглавной буквой, идентифицирующей группу кристаллической решетки (P, A, F и т.д), за которой следует символ точечной группы, в котором элементы вращения и отражения расширены для включения осей винтовой симметрии и плоскостей скользящего отражения. Заметьте, что точечная группа симметрии для данной пространственной группы может быть определена удалением
25 символа центрировки ячейки пространственной группы и замещением всех осей винтовой симметрии осями сходной симметрии и замещением всех плоскостей скользящего отражения плоскостями зеркального отражения. Точечная группа симметрии для пространственной группы описывает истинную симметрию ее обратной кристаллической решетки.

30 [0175] Выражение “базисная ячейка”, как используется в данном документе, означает атомы в кристалле, которые упорядочены в кристалле в регулярно повторяющуюся структуру, в которой наименьшая повторяющаяся единица называется базисной ячейкой. Целостную структуру можно воссоздать из данных о базисной ячейке, которая характеризуется тремя размерностями (a, b и c) и тремя углами (α , β , и γ). Величины a
35 и b представляют собой размерности сторон основания ячейки, а γ представляет собой угол между двумя этими сторонами. Величина c представляет собой высоту базисной ячейки. Углы α и β описывают углы между основанием и вертикальными сторонами базисной ячейки.

[0176] Выражение “машиночитаемый накопитель данных”, как используется в данном документе, означает материал для хранения информации, закодированный
40 машиночитаемыми командами, где устройство программируют с использованием команд для использования таких данных и оно способно отображать данные в необходимом формате, например, графическом трехмерном представлении молекул или молекулярных комплексов.

45 [0177] Выражение “дифракционная рентгенограмма” означает рентгенограмму, полученную в результате рассеяния рентгеновского излучения периодическим ансамблем молекул или атомов в кристалле. Рентгеноструктурная кристаллография представляет собой методику, в которой используется тот факт, что рентгеновское излучение

рассеивается кристаллами. Рентгеновское излучение характеризуется определенной длиной волны (в диапазоне в ангстремах, приблизительно 10^{-8} см), подлежащей рассеиванию облаком электронов атома сопоставимого размера. Исходя из дифракционной рентгенограммы, полученной в результате рассеяния рентгеновского излучения периодическим ансамблем молекул или атомов в кристалле можно воссоздать распределение электронной плотности. Дополнительную фазовую информацию можно получить либо из данных дифракции, либо из дополняющих экспериментов по дифракции для завершения воссоздания (фазовая проблема в кристаллографии). Модель прогрессивно встроена в экспериментальную плотность электронов, уточненную относительно данных для получения точной молекулярной структуры. Рентгеновская структура координат определяет уникальную конфигурацию точек в пространстве. Специалисты в данной области поймут, что совокупность структурных координат для белка или комплекса белок-лиганд или его части определяет относительно совокупность точек, что в свою очередь определяет конфигурацию в трех измерениях. Сходную или идентичную конфигурацию можно определить с помощью совершенно различного набора координат, при условии, что расстояния и углы между координатами остаются практически одинаковыми. Кроме того, конфигурацию точек можно определить путем увеличения или уменьшения расстояний между координатами посредством скалярного множителя с сохранением при этом практически таких же углов.

[0178] Выражение “кристаллическая структура”, как используется в данном документе, относится к пространственной или кристаллической сборке повторяющихся атомных или молекулярных единиц в кристаллическом материале. Кристаллическую структуру кристаллического материала можно определить с помощью способов рентгеноструктурной кристаллографии, см., например, “Principles of Protein X-Ray Crystallography” by Jan Drenth, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer Verlag, 2nd ed., February 199, ISBN: 0387985875, и “Introduction to Macromolecular Crystallography” by Alexander McPherson, Wiley-Liss, Oct. 18, 2002, ISBN: 0471251224.

[0179] Выражение “эффекторная функция” относится к таковым биологическим активностям антитела или фрагмента антитела, присущим Fc-участку (нативный Fc-участок или вариант аминокислотной последовательности Fc-участка) антитела, и которые изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q и комплементзависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция клеточных поверхностных рецепторов (например, рецепторов В-клеток) и активация В-клеток.

[0180] Выражение “антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность” или “ADCC” относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc-рецепторами (FcR), представленными на определенных цитотоксических клетках (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), что дает возможность данным цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антиген-несущей клеткой-мишенью и в дальнейшем уничтожать клетки-мишени с помощью цитотоксинов.

[0181] Выражение “Fc-рецептор” или “FcR” описывает рецептор, который связывается с Fc-участком антитела. FcR может быть нативной последовательностью FcR человека. FcR может связывать IgG-антитело (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и подвергнутые альтернативному сплайсингу формы данных рецепторов. Выражение также включает

неонатальный рецептор FcRn.

[0182] Выражение “консенсусная последовательность” относится к белковой последовательности, которая демонстрирует наиболее часто встречающиеся аминокислоты в конкретном положении после множественного выравнивания последовательностей. Консенсусная последовательность представляет собой способ представления результатов множественного выравнивания последовательностей при сравнении друг с другом родственных последовательностей. Консенсусная последовательность показывает, какие остатки являются наиболее распространенными при выравнивании в каждом положении, и степень вариативности в каждом положении.

Введение

[0183] CD40L (также известный как CD154, CD40-лиганд, gp39 или TBAM) представляет собой 33 кДа мембранный гликопротеин типа II (Swiss-ProtAcc-No P29965).

Дополнительно, существуют более короткие 18 кДа растворимые формы CD40L (также известны как sCD40L или растворимый CD40L). Эти растворимые формы CD40L получают с помощью протеолитического процессинга мембраносвязанного белка, но клеточная активность растворимой разновидности является слабой при отсутствии олигомеризации более высокого порядка (например, тримеризации).

[0184] Настоящее изобретение предлагает семейство рекомбинантных, не встречающихся в природе белковых каркасных структур (Tn3-каркасные структуры), способных связываться с CD40L. В частности, белки, описанные в данном документе, можно использовать для выявления определенных петель, которые являются аналогичными по отношению к участкам, определяющим комплементарность ("CDR") вариативного участка антител. Эти петли могут подвергаться рандомизации или перегруппировке с ограничениями для получения разнообразия, обеспечивающего способность к связыванию с множеством соединений-мишеней. Tn3-каркасные структуры можно использовать в виде мономеров или составить в мультимерные каркасные структуры, способные к связыванию с CD40L.

[0185] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает средства для CD40L-специфичного связывания, которые пригодны для предупреждения, уменьшения интенсивности, выявления, диагностики или контроля заболеваний, как, например, но без ограничения, аутоиммунное заболевание. В других конкретных вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению пригодны для лечения аутоиммунных заболеваний и состояний. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунные заболевания могут включать, но без ограничения, системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA), рассеянный склероз (MS), воспалительное заболевание кишечника (IBD) и отторжение аллотрансплантата.

[0186] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат CD40L-специфичные мономерные субъединицы, происходящие из третьего FnIII-домена теназина С человека, в которых сконструировали по меньшей мере одну не встречающуюся в природе внутримолекулярную дисульфидную связь. Мономерные субъединицы, которые составляют Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению, точно уложены независимо друг от друга с сохранением их специфичности связывания и аффинности, и каждая из мономерных каркасных структур сохраняет свои функциональные свойства. Если мономерные субъединицы собраны в мультимерные Tn3-каркасные структуры с высокой валентностью, мономерные субъединицы точно уложены независимо друг от друга с сохранением их специфичности связывания и аффинности, и каждый из мономеров сохраняет свои функциональные

свойства.

[0187] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению, содержащие более одной мономерной субъединицы, могут связываться со множеством эпитопов, например, (i) связываться со множеством эпитопов в одной мишени, (ii) связываться с одним эпитопом во множестве мишеней, (iii) связываться со множеством эпитопов, расположенных на различных субъединицах одной мишени, или (iv) связываться со множеством эпитопов на множестве мишеней с повышением, таким образом, avidности.

[0188] Кроме того, в связи с возможностью варьировать расстояние между множеством мономеров посредством линкеров мультимерные Tn3-каркасные структуры являются способными к связыванию со множеством молекул-мишеней на поверхности (или на одной и той же клетке/поверхности, или на различных-клетках/поверхностях). Вследствие их способности связываться одновременно с более, чем одной мишенью, мультимерную Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению можно использовать для модуляции множества каскадов реакций, перекрестного связывания с рецепторами на поверхности клетки, связывания поверхностных клеточных рецепторов на отдельных клетках и/или связывания молекул-мишеней или клеток с субстратом.

[0189] Дополнительно, настоящее изобретение предлагает каркасные структуры со зрелой аффинностью, где аффинность каркасной структуры для конкретной мишени модулируют посредством мутации. Также, настоящее изобретение предлагает способы получения каркасных структур по настоящему изобретению, а также способы конструирования каркасных структур с желаемыми физико-химическими, фармакологическими или иммунологическими свойствами. Более того, настоящее изобретение предлагает применения таких каркасных структур и способы терапевтического, профилактического и диагностического применения.

Структурный мотив FnIII

[0190] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению основаны на структуре модуля фибронектина (FnIII) типа III, домена, широко распространенного среди всех трех надцарств живых организмов и вирусов и во множестве классов белков. В конкретных вариантах осуществления каркасные структуры по настоящему изобретению происходят из третьего FnIII-домена теназина С человека (см. международную заявку №, международную заявку № PCT/US2008/012398, опубликованную в качестве WO 2009/058379; PCT/US2011/032184, опубликованную в качестве WO 2011/130324; и международную заявку № PCT/US2011/032188, опубликованную в качестве WO2011130328).

[0191] В одном конкретном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат CD40L-специфичную мономерную субъединицу, происходящую из исходной Tn3-каркасной структуры. Общая трехмерная укладка мономера тесно связана с таковой у наименьшего функционального фрагмента антитела, переменного участка тяжелой цепи (VH), который в однодоменных антителах, полученных от верблюдов и верблюдовых (например, лам), содержит целую антиген-распознающую единицу.

[0192] Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению и нативный FnIII-домен из теназина С характеризуются одинаковой третичной структурой, называемой структура "бета-сэндвич" с тремя бета-цепями (A, B, и E) с одной стороны и четырьмя бета-цепями (C, D, F и G) с другой стороны, соединенными шестью петлевыми участками. Эти петлевые участки обозначены в соответствии с бета-цепями, соединенными с N- и C-концами каждой петли. Соответственно, петля АВ расположена между бета-цепями A и B, петля BC расположена между бета-цепями B и C, петля CD расположена между

бета-цепями С и D, петля DE расположена между бета-цепями D и E, петля EF расположена между бета-цепями E и F, и петля FG расположена между бета-цепями F и G. FnIII-домены содержат открытую для растворителя петлю, толерантную к рандомизации, что облегчает образование различных пулов белковых каркасных структур, способных связываться со специфическими мишенями с высокой аффинностью.

[0193] В одном аспекте настоящего изобретения Tn3-мономерные субъединицы, подвергнутые прямой перегруппировке, конструируют для рандомизации одной или нескольких петель, которые аналогичны участкам, определяющим комплементарность (CDR), в варибельном участке антитела. Такой принцип прямой перегруппировки в результате приводит к получению антителоподобных молекул с высокими аффинностями к мишеням, представляющим интерес, например, CD40L.

[0194] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры, описанные в данном документе, можно использовать для выявления открытых петель (например, предварительно рандомизированные петли и выбранные на основе мишени для связывания) для прямой перегруппировки молекул, которые связываются с такими введенными петлями. Этот тип отбора можно осуществлять для идентификации молекул для узнавания применительно к любой отдельной CDR-подобной петле или, в качестве альтернативы, для узнавания двух или трех CDR-подобных петель, объединенных в нелинейном эпитоп-связывающем фрагменте. Группа из трех петель (обозначенных BC, DE и FG), которые могут обеспечивать мишень-специфическое связывание, уложена между цепями В и С; цепями D и E и бета-цепями F и G, соответственно. Петли BC, DE и FG третьего FnIII-домена тенасцина С человека имеют длину 9, 6 и 10 аминокислотных остатков, соответственно. Длина этих петель находится в узком пределе когнатных антиген-распознающих петель, обнаруженных в тяжелых цепях антител, и составляет 7-10, 4-8 и 4-28 аминокислот в длину, соответственно. Подобным образом, вторая группа петель, петли AB, CD и EF (7, 7 и 8 аминокислот в длину, соответственно) уложены между бета-цепями А и В; бета-цепями С и D и бета-цепями E и F, соответственно.

[0195] После того, как рандомизированы и отобраны по высокой аффинности связывания с мишенью, петли в Tn3-мономерной каркасной структуре могут образовывать контакты с мишенями, эквивалентные контактам когнатных CDR-петель у антител. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления петли AB, CD и EF рандомизированы и отобраны по высокой аффинности связывания с одной или несколькими мишенями, например, CD40L. В некоторых вариантах осуществления данный способ рандомизации и отбора можно осуществлять параллельно с рандомизацией петель BC, DE и FG, при этом в других вариантах осуществления данный способ рандомизации и отбора проводят последовательно.

CD40L-специфичные мономерные субъединицы

[0196] Настоящее изобретение предлагает CD40L-специфичные рекомбинантные, не встречающиеся в природе Tn3-каркасные структуры, содержащие множество доменов с бета-цепями, связанными со множеством петлевых участков, где в один или несколько указанных петлевых участков вносят изменения путем делеции, замены или добавления по меньшей мере одной аминокислоты из когнатных петель в Tn3 дикого типа (SEQ ID NO: 3) (см. Таблицу 1).

[0197] Для получения улучшенных CD40L-специфичных Tn3-мономерных субъединиц с новыми характеристиками связывания исходный Tn3 подвергают добавлениям, делециям или заменам аминокислот. Будет понятно, что при сравнении последовательности CD40L-специфичной Tn3-мономерной субъединицы с

последовательностью исходной Tn3 используют одинаковое определение бета-цепей и петель. В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению содержат аминокислотную

последовательность:

5 IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT,

где

(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF}, и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG, соответственно;

10 (b) X₁ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T); и

(c) длина петли *n* представляет собой целое число от 2 до 26.

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 2. Последовательности петли Tn3-клонов, использованные в данных исследованиях

Клон	Петля AB SEQ ID NO	Петля BC SEQ ID NO	Петля CD SEQ ID NO	Петля DE SEQ ID NO	Петля EF SEQ ID NO	Петля FG SEQ ID NO*
ИСХОДНЫЙ Tn3						
Tn3	4	5	6	7	8	9
СЕМЕЙСТВО 309						
309FGwt	4	83	6	94	8	9
309	4	83	6	94	8	99
340	4	84	6	95	8	9
341	4	85	6	94	8	9
342	4	86	6	96	8	9
343	4	87	6	97	8	9
344	4	88	6	95	8	9
345	4	89	6	94	8	9
346	4	90	6	94	8	9
347	4	91	6	95	8	9
348	4	92	6	98	8	9
349	4	93	6	94	8	9
Консенсусная последовательность 309FGwt	4	168	6	169	8	170
СЕМЕЙСТВО 311**						
311	4	100	6	118	8	129
311K4E	136	100	6	118	137	129
311K4E_1	136	101	6	119	8	129
311K4E_2	136	102	6	120	8	129
311K4E_3†	136	103	6	121	8	129
311K4E_4†	136	104	6	122	8	129
311K4E_5†	136	105	6	121	8	129
311K4E_7	136	106	6	123	8	129
311K4E_8†	136	107	6	123	8	129
311K4E_9	136	108	6	118	8	129
311K4E_10†	136	109	6	123	8	129
311K4E_11	136	110	6	121	8	129
311K4E_12†	136	111	6	123	8	130
311K4E_13	136	108	6	121	8	129
311K4E_14	136	112	6	124	8	129
311K4E_15	136	113	6	125	8	129
311K4E_16	136	114	6	118	8	129
311K4E_19	136	115	6	126	8	129
311K4E_20	136	116	6	127	8	129
311K4E_21	136	117	6	128	8	129
консенсусная последовательность 311	173	174	6	175	176	177

† Клоны, содержащие бета-цепь C, имеющую последовательность CELAYGI (SEQ ID NO: 14), при этом все другие клоны содержат бета-цепь C, имеющую последовательность CELTYGI (SEQ ID NO: 13).

* В некоторых вариантах в семействе 309, например, 342, петлю FG можно заменить

на SEQ ID NO: 139.

****** В некоторых вариантах в семействе 311 петлю BC можно сконструировать с заменой тирозина в положении 21. Специально предусмотрено, что замещающие аминокислотные остатки могут иметь малую боковую цепь.

[0198] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению состоят из аминокислотной последовательности:

$IEV(X_{AB})_n ALITW(X_{BC})_n CELX_1 YGI(X_{CD})_n TTIDL(X_{DE})_n YSI(X_{EF})_n YEVS LIC(X_{FG})_n KETFTT$,

где

(a) X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG, соответственно;

(b) X_1 представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T); и

(c) длина петли n представляет собой целое число от 2 до 26.

[0199] В одном варианте осуществления бета-цепи CD40L-специфичной Tn3-мономерной каркасной структуры имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательности с бета-цепями исходной Tn3-каркасной структуры (SEQ ID NO: 3). Для вычисления такого процента идентичности последовательности аминокислотные последовательности выравнивают с помощью способов, известных в данной области техники. Процент идентичности аминокислотной последовательности определяют как соотношение между (a) числом аминокислот, расположенных в бета-цепях, которые идентичны в выравнивании последовательности, и (b) общим числом аминокислот, расположенных в бета-цепи.

[0200] В одном варианте осуществления последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 136. В другом варианте осуществления последовательность петли CD содержит SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления последовательность петли EF содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 137. В одном варианте осуществления последовательность петли AB состоит из SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 136. В другом варианте осуществления последовательность петли CD состоит из SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления последовательность петли EF состоит из SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 137.

[0201] В одном варианте осуществления последовательность петли BC содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 и 93. В другом варианте осуществления последовательность петли BC состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 и 93.

[0202] В одном варианте осуществления последовательность петли DE содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 95, 96, 97 и 98. В другом варианте осуществления последовательность петли DE состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 95, 96, 97 и 98.

[0203] В одном варианте осуществления последовательность петли FG содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 99 и 139. В другом варианте осуществления последовательность петли FG состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 99 и 139.

[0204] В одном варианте осуществления последовательность петли BC содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 и 117. В другом варианте

NO: 113, последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 125 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 129.

[0235] В некоторых вариантах осуществления последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 114,

последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 118 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В других вариантах осуществления последовательность петли AB состоит из SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC состоит из SEQ ID NO: 114, последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 118 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 129.

[0236] В некоторых вариантах осуществления последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 115,

последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 126 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В других вариантах осуществления последовательность петли AB состоит из SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC состоит из SEQ ID NO: 115, последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 126 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 129.

[0237] В некоторых вариантах осуществления последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 116,

последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 127 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В других вариантах осуществления последовательность петли AB состоит из SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC состоит из SEQ ID NO: 116, последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 127 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 129.

[0238] В некоторых вариантах осуществления последовательность петли AB содержит SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 117,

последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 128 и последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 129. В других вариантах осуществления последовательность петли AB состоит из SEQ ID NO: 136, последовательность петли BC состоит из SEQ ID NO: 117, последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 128 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 129.

[0239] В некоторых вариантах осуществления последовательность петли BC содержит SEQ ID NO: 174, последовательность петли DE содержит SEQ ID NO: 175 и

последовательность петли FG содержит SEQ ID NO: 177. В других вариантах осуществления последовательность петли BC состоит из SEQ ID NO: 174,

последовательность петли DE состоит из SEQ ID NO: 175 и последовательность петли FG состоит из SEQ ID NO: 177.

[0240] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 и 146. В других вариантах осуществления

CD40L-специфичная мономерная субъединица состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 и 146.

[0241] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица содержит SEQ ID NO: 28 или 146. В других вариантах осуществления

CD40L-специфичная мономерная субъединица состоит из SEQ ID NO: 28 или 146.

[0242] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀A
X₁₁YSIGNLKPDTYEYVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167),

где

(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или лейцин (L);

(b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), изолейцин (I), валин (V), фенилаланин (F) или триптофан (W);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A), глицин (G), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), глутамин (Q), серин (S), аспарагиновую кислоту (D) или аспарагин (N);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I), валин (V), гистидин (H), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), триптофан (W) или валин (V);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), метионин (M) или гистидин (H);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W) или гистидин (H); и

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток аргинин (R) или серин (S).

[0243] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению состоят из аминокислотной последовательности:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀A
X₁₁YSIGNLKPDTYEYVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167),

где

(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или лейцин (L);

(b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), изолейцин (I), валин (V), фенилаланин (F) или триптофан (W);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A), глицин (G), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), глутамин (Q), серин (S), аспарагиновую кислоту (D) или аспарагин (N);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I), валин (V), гистидин

(H), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), триптофан (W) или валин (V);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), метионин (M) или гистидин (H);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W) или гистидин (H); и

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток аргинин (R) или серин (S).

[0244] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 и 82. В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 и 82.

[0245] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTYX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171),

где

(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток лизин (K) или глутаминовую кислоту (E);

(b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток треонин (T) или изолейцин (I);

(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N) или аланин (A);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), лейцин (L), аланин (A), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), аланин (A), глицин (G), валин (V), изолейцин (I) или серин (S);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), серин (S), аланин (A) или гистидин (H);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D), гистидин (H) или тирозин (Y);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток лейцин (L), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), пролин (P), серин (S), лейцин (L) или аспарагиновую кислоту (D);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T);

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), аспарагин (N),

глутаминовую кислоту (E), аспарагин (R) или аспарагиновую кислоту (D);

(m) X₁₃ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), треонин (T), аспарагин (N) или аланин (A);

(n) X₁₄ представляет собой аминокислотный остаток пролин (P), валин (V), изолейцин (I) или аланин (A) или не является аминокислотой;

(o) X₁₅ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I) или не является аминокислотой;

(p) X₁₆ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E) или лизин (K); и

(q) X₁₇ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или аспарагин (N).

[0246] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению состоят из аминокислотной последовательности:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTDDGTXYX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171),

где

(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток лизин (K) или глутаминовую кислоту (E);

(b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток треонин (T) или изолейцин (I);

(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N) или аланин (A);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), лейцин (L), аланин (A), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), аланин (A), глицин (G), валин (V), изолейцин (I) или серин (S);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), серин (S), аланин (A) или гистидин (H);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D), гистидин (H) или тирозин (Y);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток лейцин (L), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), пролин (P), серин (S), лейцин (L) или аспарагиновую кислоту (D);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T);

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), аспарагин (N), глутаминовую кислоту (E), аспарагин (R) или аспарагиновую кислоту (D);

(m) X₁₃ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), треонин (T), аспарагин (N) или аланин (A);

(n) X₁₄ представляет собой аминокислотный остаток пролин (P), валин (V), изолейцин (I) или аланин (A) или не является аминокислотой;

(o) X₁₅ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I) или не является аминокислотой;

(p) X₁₆ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E) или лизин (K); и

(q) X₁₇ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или аспарагин (N).

[0247] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная каркасная структура содержит Tn3-модуль, где одна или несколько бета-цепей содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену за исключением того, что остатки цистеина в бета-цепях C и F (SEQ ID NO: 13 или 14 и SEQ ID NO: 17, соответственно) могут не быть замененными.

[0248] Петли, соединяющие различные бета-цепи CD40L-специфичной мономерной субъединицы, можно рандомизировать по длине и/или вариабельности последовательности. В одном варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица имеет по меньшей мере одну петлю, которая рандомизирована по длине и/или вариабельности последовательности. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть петель CD40L-специфичной мономерной субъединицы рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна петля CD40L-специфичной мономерной субъединицы сохранена неизменной, тогда как по меньшей мере одна дополнительная петля рандомизирована по длине и/или вариабельности последовательности. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли AB, CD и EF сохранены неизменными, тогда как по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли BC, DE и FG рандомизированы по длине или вариабельности последовательности. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли AB, CD и EF рандомизированы, тогда как по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли BC, DE и FG рандомизированы по длине или вариабельности последовательности. В еще одном варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере 4, по меньшей мере пять или все шесть петель AB, CD, EF, BC, DE и FG рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности.

[0249] В некоторых вариантах осуществления один или несколько остатков в пределах петли оставлены неизменными, тогда как другие остатки рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности. В некоторых вариантах осуществления один или несколько остатков в пределах петли ограничены заранее определенным и ограниченным числом различных аминокислот, тогда как другие остатки рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности. Соответственно, CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению может содержать одну или несколько петель, имеющих вырожденную консенсусную последовательность и/или один или несколько инвариантных аминокислотных остатков.

[0250] В одном варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю AB, которая является рандомизированной. В другом варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю BC, которая является рандомизированной. В одном варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю CD, которая является рандомизированной.

В одном варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю DE, которая является рандомизированной. В одном варианте осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю EF, которая является рандомизированной.

5 [0251] В конкретных вариантах осуществления CD40L-специфичная мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит петлю FG, которая является по меньшей мере на один аминокислотный остаток более короткой, чем когнатная петля FG третьего FnIII-домена тенастина С человека, и дополнительно рандомизирована по одному или нескольким положениям.

10 [0252] В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна из петель BC, DE и FG рандомизирована, причем бета-цепь А содержит SEQ ID NO:10 или 11, бета-цепь В содержит SEQ ID NO:12, бета-цепь С содержит SEQ ID NO:13 или 14, бета-цепь D содержит SEQ ID NO:15, бета-цепь Е содержит SEQ ID NO:16, бета-цепь F содержит SEQ ID NO:17 и бета-цепь G содержит SEQ ID NO:18, петля AB содержит SEQ ID NO:4
15 или 136, петля CD содержит SEQ ID NO:6 и петля EF содержит SEQ ID NO:8 или 137.

[0253] В других конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна из петель AB, CD и EF рандомизирована, причем бета-цепь А содержит SEQ ID NO:10 или 11, бета-цепь В содержит SEQ ID NO:12, бета-цепь С содержит SEQ ID NO:13 или 14, бета-цепь D содержит SEQ ID NO:15, бета-цепь Е содержит SEQ ID NO:16, бета-цепь F
20 содержит SEQ ID NO:17 и бета-цепь G содержит SEQ ID NO:18, петля BC содержит SEQ ID NO:5, петля DE содержит SEQ ID NO:7 и петля FG содержит SEQ ID NO:9 или 139.

Повышенная стабильность каркасной структуры

[0254] Стабильность Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению можно увеличить с помощью различных подходов. В некоторых вариантах осуществления
25 Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению можно стабилизировать путем удлинения N- и/или C-концевых участков. N- и/или C-концевые участки можно удлинить на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 аминокислот. В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению можно стабилизировать путем введения изменения, которое увеличивает время полужизни в сыворотке, как описано
30 в данном документе. В еще одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат добавление, делецию или замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка для стабилизации гидрофобного кора каркасной структуры.

[0255] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут быть эффективно
35 стабилизированы путем конструирования дисульфидных связей, не относящихся к природным, как раскрыто в международной заявке на патент № PCT/US2011/032184. В некоторых вариантах осуществления каркасные структуры по настоящему изобретению содержат не встречающиеся в природе дисульфидные связи, как описано в PCT публикации № WO 2009/058379. Биоинформационные подходы можно
40 использовать для выявления кандидатных положений, пригодных для конструирования дисульфидных связей.

[0256] В одном варианте осуществления Tn3-мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять не встречающихся в природе
45 внутримолекулярных дисульфидных связей. В одном варианте осуществления Tn3-мономерная субъединица по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну не встречающуюся в природе внутримолекулярную дисульфидную связь, где указанная по меньшей мере одна не встречающаяся в природе дисульфидная связь стабилизирует

мономер. В еще одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну не встречающуюся в природе дисульфидную связь, где данная связь расположена между двумя отдельными мономерными или мультимерными Tn3-каркасными структурами, *т.е.* данная дисульфидная связь является внутримолекулярной дисульфидной связью. Например, дисульфидная связь может соединять отдельные каркасные структуры (например, две CD40L-специфичные мономерные каркасные структуры), Tn3-каркасную структуру и линкер, или Tn3-каркасную структуру и Fc-домен, или Tn3-каркасную структуру и антитело или его фрагмент.

[0257] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну не встречающуюся в природе внутримолекулярную дисульфидную связь, которая соединяет Tn3-мономерную субъединицу и выделенный гетерологичный фрагмент, Tn3-мономерную субъединицу и гетерологичный фрагмент, слитый или конъюгированный с такой же Tn3-каркасной структурой, или Tn3-мономерную субъединицу и гетерологичный фрагмент, слитый или конъюгированный с другой Tn3-каркасной структурой.

[0258] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат дисульфидную связь, которая образует Tn3-мультимерную каркасную структуру из по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или более мономерных субъединиц.

[0259] В другом варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут предусматривать удлинение N- и/или C-концевых участков. В одном варианте осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит изменение для увеличения времени полужизни в сыворотке, как описано в данном документе. В еще одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат добавление, делецию или замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка для стабилизации гидрофобного кора каркасной структуры.

Измерения стабильности

[0260] Стабильность Tn3-мономерных субъединиц по настоящему изобретению, выделенных или в виде части мультимерной Tn3-каркасной структуры, можно легко измерять с помощью методик, хорошо известных в данной области техники, таких как термическая денатурация ($T_{пл}$) и хаотропная денатурация (например, обработка мочевиной или солями гуанидина), обработка протеазами (например, обработка термолизинном) или другим способом, принятым в данной области техники, для определения стабильности белка. Исчерпывающий обзор методик, используемых для измерения стабильности белка, можно найти, например, в "Current Protocols in Molecular Biology" и "Current Protocols in Protein Science" by John Wiley and Sons. 2007.

Мультимерные Tn3-каркасные структуры

[0261] Один аспект настоящего изобретения предлагает мультимерные Tn3-каркасные структуры, содержащие по меньшей мере две Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению, соединенные в тандем, и при этом по меньшей мере один из мономеров представляет собой CD40L-специфичную мономерную субъединицу. Такие мультимерные Tn3-каркасные структуры могут быть собраны во множество конфигураций. В конкретном аспекте настоящее изобретение предлагает мультимерные Tn3-каркасные структуры, где по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы соединены в тандем посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура характеризуется

повышением валентности и/или avidности в отношении связывания с мишенью или другим воздействием на мишень(и). В некоторых вариантах осуществления повышение валентности и/или avidности в отношении связывания мишени достигается, если множественные мономерные субъединицы связываются с одной и той же мишенью. В некоторых вариантах осуществления повышение валентности улучшает специфическое воздействие на мишень, такое как повышение димеризации белка-мишени.

[0262] В конкретном варианте осуществления, мультимерная Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, соединенные в тандем, причем каждая CD40L-специфичная мономерная субъединица связывает по меньшей мере одну мишень, и при этом каждая CD40L-специфичная мономерная субъединица содержит множество бета-цепей, соединенных с множеством петлевых участков, где по меньшей мере одна петля представляет собой не встречающийся в природе вариант когнатной петли в исходной Tn3-каркасной структуре (SEQ ID NO: 3).

[0263] В одном варианте осуществления мультимерные Tn3-каркасные структуры получают посредством ковалентного связывания между CD40L-специфичными мономерными субъединицами, например, путем непосредственного связывания CD40L-специфичных мономерных субъединиц или путем введения линкера, *например*, пептидного линкера. В конкретных примерах ковалентно связанные Tn3-каркасные структуры получают путем создания генов слияния, которые кодируют CD40L-специфичные мономерные субъединицы или, в качестве альтернативы, путем конструирования кодонов для остатков цистеина в CD40L-специфичных мономерных субъединицах, что обеспечивает образование дисульфидной связи между продуктами экспрессии.

[0264] В одном варианте осуществления мультимерные Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые непосредственно соединены друг с другом без какого-либо дополнительного вовлечения аминокислот. В другом варианте осуществления мультимерные Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые соединены в тандем посредством линкера, *например*, пептидного линкера.

[0265] В конкретном варианте осуществления мультимерные Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые соединены в тандем посредством пептидного линкера, причем данный пептидный линкер содержит от 1 до приблизительно 1000, или от 1 до приблизительно 500, или от 1 до приблизительно 250, или от 1 до приблизительно 100, или от 1 до приблизительно 50, или от 1 до приблизительно 25 аминокислот. В конкретном варианте осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые соединены в тандем посредством пептидного линкера, причем данный пептидный линкер содержит от 1 до приблизительно 20, или от 1 до приблизительно 15, или от 1 до приблизительно 10, или от 1 до приблизительно 5 аминокислот.

[0266] В конкретном варианте осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые соединены в тандем посредством линкера, *например*, пептидного линкера, причем данный линкер представляет собой функциональный фрагмент. Данный функциональный фрагмент будут выбирать исходя из требуемых функций и/или характеристик мультимерной Tn3-каркасной структуры. Например, функциональный

фрагмент, пригодный для очистки (*например*, гистидиновая метка) можно использовать в качестве линкера. Функциональные фрагменты, пригодные в качестве линкеров, включают, но без ограничения, полиэтиленгликоль (PEG), цитотоксическое средство, радионуклид, радиофармацевтическое средство, биотин, домен димеризации, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его участок, отвечающий за связывание с FcRn, домен или фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, антитело на основе домена, альбумин-связывающий домен, молекулу IgG, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасную структуру, отличающуюся от Tn3, эпитопную метку, рекомбинантный полипептидный полимер, цитокин и тому подобные. Конкретные пептидные линкеры и функциональные фрагменты, которые можно использовать в качестве линкеров, раскрыты *ниже*.

[0267] В конкретных вариантах осуществления данная функциональная группа представляет собой иммуноглобулин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данный иммуноглобулин или его фрагмент содержит Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления данный Fc-домен не индуцирует по меньшей мере одну FcγR-опосредованную эффекторную функцию, такую как ADCC (антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность). В данной области техники известно, что Fc-домен может быть подвергнут изменению для снижения или подавления по меньшей мере одной FcγR-опосредованной эффекторной функции, см., например, патенты США №№ 5624821 и 6737056.

[0268] В некоторых вариантах осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, которые связаны посредством одного или нескольких линкеров, где эти линкеры, помещенные между каждой CD40L-специфичной мономерной субъединицей, могут быть одинаковыми линкерами или различными линкерами. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать множество линкеров, которые могут быть одинаковыми линкерами или различными линкерами. В некоторых вариантах осуществления, если множество линкеров взаимозависимо соединены, некоторые или все линкеры могут быть функциональными фрагментами.

Стехиометрия связывания каркасной структуры

[0269] В некоторых вариантах осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может содержать CD40L-специфичную мономерную субъединицу, специфическую по отношению к различным эпитопам, которые могут представлять собой различные эпитопы на одной молекуле CD40L или на различных молекулах-мишенях CD40L. В некоторых вариантах осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура может содержать CD40L-специфичные мономерные субъединицы, где каждая субъединица нацеливается на один или несколько различных эпитопов на одной или нескольких молекулах CD40L.

[0270] В других вариантах осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связывать два или более различных эпитопов на одной и той же молекуле CD40L. В некоторых вариантах осуществления данные различные эпитопы представляют собой неперекрывающиеся эпитопы. В других вариантах осуществления данные различные эпитопы представляют собой перекрывающиеся эпитопы.

[0271] В еще одном конкретном варианте осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связывать один или несколько эпитопов на молекуле CD40L и дополнительно связывать один или несколько эпитопов на второй молекуле CD40L. В некоторых вариантах осуществления молекулы-мишени являются

частью олигомерного комплекса, *например*, тримерного комплекса CD40L.

[0272] В еще одном конкретном варианте осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связываться с одним эпитопом на CD40L-тримере. В еще одном варианте осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связываться с одним и тем же эпитопом по меньшей мере на двух CD40L-тримерах.

[0273] В конкретных вариантах осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связываться с одним и тем же эпитопом на двух или более копиях молекулы CD40L на поверхности смежных клеток. В конкретных вариантах осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связываться с одним и тем же эпитопом на двух или более копиях молекулы CD40L в растворе. В некоторых вариантах осуществления мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура может связываться с одним и тем же эпитопом или различными эпитопами на CD40L с одной и той же или различными аффинностями связывания и/или авидностями.

[0274] В другом варианте осуществления мономерные или мультимерные Tn3-каркасные структуры могут связываться с эпитопом на одной или нескольких копиях CD40L и достигать или усиливать (*например*, синергетически) необходимое воздействие на мишень, *например*, препятствовать связыванию с рецептором или препятствовать олигомеризации.

[0275] Кроме того, если мономерная или мультимерная Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит множество CD40L-специфичных мономерных субъединиц, *например*, различные мономеры, причем каждый мономер нацелен на различные эпитопы на CD40L, такие мономерные субъединицы могут быть упорядочены в соответствии с определенной структурой или специальной ориентацией для достижения или усиления определенного биологического эффекта. Такие комбинации мономерных субъединиц можно собрать и в дальнейшем оценить с использованием способов, известных в данной области техники.

Слияния

[0276] Настоящее изобретение предлагает Tn3-каркасные структуры, где по меньшей мере одна CD40L-специфичная мономерная субъединица может быть слитой с гетерологичным фрагментом. В данном контексте гетерологичный фрагмент не используют для соединения каркасных структур в качестве спейсера, но он может обеспечивать Tn3-каркасную структуру дополнительной функциональностью. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент также может выполнять функцию линкера. Настоящее изобретение охватывает применение Tn3-каркасных структур, конъюгированных или слитых с одним или несколькими гетерологичными фрагментами, включая, но без ограничения, пептиды, полипептиды, белки, белки слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, малые молекулы, средства-миметики, синтетические лекарственные средства, неорганические молекулы и органические молекулы. Соответственно, настоящее изобретение предлагает полипептиды, содержащие один или несколько CD40L-специфичных Tn3-мономеров, включая, но без ограничения, белки слияния, описанные в данном документе.

[0277] Настоящее изобретение охватывает применение Tn3-каркасных структур, рекомбинантно слитых или химически конъюгированных с гетерологичным белком, или полипептидом, или их фрагментом. Конъюгация включает как ковалентную, так и нековалентную конъюгацию. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура может быть слитой или химически конъюгированной с полипептидом из по

меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 1000 аминокислот для получения белков слияния.

5 [0278] Слияние или конъюгирование Tn3-каркасной структуры с одним или несколькими гетерологичными фрагментами может быть непосредственным, *т.е.* без линкера, уложенного между Tn3-каркасной структурой и гетерологичным фрагментом, или посредством одной или нескольких линкерных последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления каркасные структуры
10 можно применять для нацеливания гетерологичных полипептидов на конкретные типы клеток, либо *in vitro*, либо *in vivo*, путем слияния или конъюгирования Tn3-каркасных структур с антителами, специфическими по отношению к конкретным рецепторам на поверхности клетки у целевых клеток.

[0279] Tn3-каркасные структуры, которые являются слитыми или конъюгированными
15 с гетерологичными полипептидами, также можно использовать в иммунологических анализах *in vitro* и способах очистки с использованием способов, известных в данной области техники. См., *например*, международную публикацию № WO 93/21232; европейский патент № EP 439095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39:91-99, 1994; патент США № 5474981; Gillies *et al.*, PNAS 89:1428-1432, 1992 и Fell *et al.*, J. Immunol. 146:2446-
20 2452, 1991, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

[0280] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры могут быть сопряжены с иммунным ответом человека путем слияния или конъюгирования каркасной структуры с иммуноглобулином или его доменом, включая, но без ограничения,
25 константный участок IgG (Fc), *например*, через N- или C-конец. Подобным образом, слияние между Tn3-каркасной структурой и белком комплемента, таким как C1q, можно использовать для нацеливания на клетки.

[0281] Различные публикации, в которых описываются способы получения физиологически активных молекул, время полужизни которых модифицировано путем
30 введения в молекулы FcRn-связывающего полипептида (см., *например*, WO 97/43316; патент США № 5869046; патент США № 5747035; WO 96/32478 и WO 91/14438) путем связывания молекул с антителами, FcRn-связывающие аффинности которых сохранены, но аффинности для других Fc-рецепторов были в значительной степени снижены (см., *например*, WO 99/43713), или путем слияния молекул с FcRn-связывающими доменами
35 антител (смотри, *например*, WO 00/09560; патент США № 4703039). Специальные методики и способы увеличения времени полужизни физиологически активных молекул также можно найти в патенте США № 7083784. Более конкретно, полагают, что Tn3-каркасные структуры могут быть слиты с Fc-участком из IgG, где данный Fc-участок содержит мутации аминокислотного остатка M252Y/S254T/T256E или H433K/N434F/
40 Y436H, где положения аминокислот обозначены в соответствии со схемой нумерации по Kabat. В особенности, предполагают, что слияние Tn3-каркасной структуры с вариантом Fc-домена не способно индуцировать ADCC.

[0282] В некоторых вариантах осуществления время полужизни Tn3-каркасной структуры может быть увеличено путем слияния при помощи методик генной инженерии
45 Tn3-каркасной структуры, по сути, с неструктурированным рекомбинантным полипептидом (*например*, полипептид XTENTM) или путем конъюгации с полиэтиленгликолем (PEG).

[0283] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура может быть

слитой с молекулами, которые увеличивают или удлиняют *in vivo* время полужизни в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления данная каркасная структура может быть слитой или конъюгированной с альбумином, таким как человеческий сывороточный альбумин (HSA), неонатальным Fc-рецептором (FcRn) или его связывающем фрагментом, PEG, полисахаридами, антителами, комплементом, гемоглобином, связывающим пептидом, липопротеинами и другими факторами для увеличения ее времени полужизни в кровотоке и/или ее тканевой проницаемости. Любое из данных слияний можно получить с помощью стандартных методик, например, путем экспрессии белка слияния из рекомбинантного гена слияния, сконструированного с использованием общедоступных последовательностей генов.

[0284] В некоторых вариантах осуществления, свойство Tn3-каркасной структуры может быть улучшено путем конъюгации или слияния с вариантом HSA, т.е. молекула, полученная из полноразмерного HSA (SEQ ID NO: 139), содержащая по меньшей мере аминокислотную замену, делецию или усечение последовательности.

[0285] В некоторых вариантах осуществления свойство, улучшенное при помощи конъюгации с вариантом HSA, представляет собой время полужизни в плазме. Улучшение времени полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры может представлять собой изменение в таком смысле, как увеличение или уменьшение времени полужизни в плазме, или изменения в других фармакокинетических параметрах. В некоторых вариантах осуществления вариант HSA представляет собой мутант, полученный из полноразмерного HSA (SEQ ID NO: 138). В конкретном варианте осуществления вариант HSA включает замену цистеина в положении 34 на серин (SEQ ID NO: 133). Варианты HSA, которые можно использовать для модифицирования времени полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, описаны, например, в международных публикациях WO 2011/103076 и WO 2011/051489, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению увеличивают путем слияния с вариантом HSA, содержащим по меньшей мере одну аминокислотную замену в домене III HSA.

[0286] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит вариант HSA, содержащий последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, в положении, выбранном из группы, состоящей из 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 и 580; при этом по меньшей мере одна аминокислотная замена не предусматривает замену лизина (K) на глутаминовую кислоту (E) в положении 573, и при этом Tn3-каркасная структура характеризуется большим временем полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с вариантом HSA.

[0287] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена, пронумерованная относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, находится в положении, выбранном из группы, состоящей из 463, 508, 523 и 524, причем указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с вариантом HSA.

[0288] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит вариант HSA, содержащий последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей

мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) замены лейцина (L) в положении 407 на аспарагин (N) или тирозин (Y);
- (b) замены валина (V) в положении 415 на треонин (T);
- 5 (c) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N);
- (d) замены лизина (K) в положении 500 на аргинин (R);
- (e) замены треонина (T) в положении 506 на тирозин (Y);
- (f) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R);
- (g) замены фенилаланина (F) в положении 509 на метионин (M) или триптофан (W);
- 10 (h) замены аланина (A) в положении 511 на фенилаланин (F);
- (i) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 512 на тирозин (Y);
- (j) замены треонина (T) в положении 515 на глутамин (Q);
- (k) замены лейцина (L) в положении 516 на треонин (T) или триптофан (W);
- (l) замены аргинина (R) в положении 521 на триптофан (W);
- 15 (m) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R);
- (n) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L);
- (o) замены глутамина (Q) в положении 526 на метионин (M);
- (p) замены гистидина (H) в положении 535 на пролин (P);
- 20 (q) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 550 на глутаминовую кислоту (E);
- (r) замены лизина (K) в положении 557 на глицин (G);
- (s) замены лизина (K) в положении 573 на фенилаланин (F), гистидин (H), пролин (P), триптофан (W) или тирозин (Y);
- 25 (t) замены лизина (K) в положении 574 на аспарагин (N);
- (u) замены глутамина (Q) в положении 580 на лизин (K); и
- (v) комбинации двух или более указанных замен,

где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с указанным вариантом HSA.

[0289] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит вариант HSA, содержащий последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент, за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N);
- (b) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R);
- (c) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R);
- 35 (d) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L); и
- (e) комбинации двух или более указанных замен,

где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с указанным вариантом HSA.

[0290] Более того, Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В некоторых вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой полигистидиновый пептид (His-метка), *например*, октагистидин-

метка (His-8-метка) или гексагистидин-метка (His-6-метка), как, например, метка, помещенная в вектор экспрессии pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чэтсуорт, Калифорния, 91311), наряду с прочими векторами, многие из которых являются коммерчески доступными. Как описано у Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989, к примеру, полигистидин вносят для подходящей очистки белка слияния. Другие пептидные метки, пригодные для очистки включают, но без ограничения, гемагглютининовую ("НА") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (смотри, *например*, Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984), FLAG-метку, Strep-метку, мус-метку, V5-метку, GFP-метку, AU1-метку, AU5-метку, ECS-метку, GST-метку или OLLAS-метку.

[0291] Дополнительные белки слияния, содержащие Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению, могут быть получены известными методиками перестановки генов, перестановки мотивов, перестановки экзонов и/или перестановки кодонов (вместе названных "перестановкой ДНК").

[0292] Перестановку ДНК можно использовать для внесения изменения для воздействия Tn3-каркасных структур на мишень (*например*, получение каркасных структур с более высокими аффинностями и более низкими скоростями диссоциации). Внесение изменений в Tn3-каркасные структуры можно осуществить с помощью случайного мутагенеза посредством ПЦР с использованием ошибающейся полимеразы, произвольной вставки нуклеотида или других способов перед рекомбинацией. Одна или несколько частей полинуклеотида, кодирующего каркасную структуру, которая связывается со специфической мишенью, можно рекомбинировать с одним или несколькими компонентами, мотивами, сегментами, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или нескольких гетерологичных молекул.

Слияния антитела и Fc-домена

[0293] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит CD40L-специфичную мономерную субъединицу, слитую с доменом или фрагментом антитела (*например*, IgG), в том числе, но без ограничения, Fc-доменом.

[0294] В некоторых вариантах осуществления только одна CD40L-специфичная мономерная субъединица конъюгирована или слита с доменом или фрагментом антитела. К примеру, одна CD40L-специфичная мономерная субъединица может быть слитой с N-концом полипептида домена или фрагмента антитела (*например*, тяжелая цепь или легкая цепь антитела). В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры создают путем слияния или конъюгирования одной или нескольких CD40L-специфичных мономерных субъединиц с N-концом и/или C-концом полипептида домена или фрагмента антитела (*например*, тяжелая цепь, и/или легкая цепь антитела, или Fc-домен).

[0295] В некоторых вариантах осуществления несколько или все CD40L-специфичные мономерные субъединицы, слитые с доменом или фрагментом антитела, являются идентичными. В некоторых других вариантах осуществления несколько или все CD40L-специфичные мономерные субъединицы, слитые с доменом или фрагментом антитела, являются различными.

[0296] В конкретном варианте осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит одну CD40L-специфичную мономерную субъединицу, слитую с Fc-доменом. В других вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, слитые с Fc-доменом. В одном конкретном варианте осуществления две из CD40L-специфичных мономерных субъединиц, слитых с Fc-

доменом, являются идентичными. В одном конкретном варианте осуществления две из CD40L-специфичных мономерных субъединиц, слитых с Fc-доменом, являются различными. В одном конкретном варианте осуществления две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, слитые с Fc-доменом, соединены друг с другом в тандем, и одна из CD40L-специфичных мономерных субъединиц является слитой с Fc-доменом.

[0297] В некоторых вариантах осуществления можно получить димеры различных Tn3-каркасных структур по настоящему изобретению путем использования Fc-домена с мутациями, которые способствуют образованию гетеродимеров. В данной области техники известно, что варианты Fc-участка (*например*, аминокислотные замены, и/или добавления, и/или делеции) усиливают или ослабляют эффекторную функцию антитела и могут изменять фармакокинетические свойства (*например*, время полужизни) антитела. Таким образом, в определенных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат Fc-домен (домены), которые содержат измененный Fc-участок, в котором одно или несколько изменений были осуществлены в Fc-участке для изменения функциональных и/или фармакокинетических свойств Tn3-каркасной структуры. В определенных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению содержат Fc-домен (домены), которые содержат измененный Fc-участок, в котором одно или несколько изменений были осуществлены в Fc-участке для уменьшения или устранения по меньшей мере одной FcγR-опосредованной эффекторной функции.

[0298] Также известно, что гликозилирование Fc-участка можно модифицировать для повышения или понижения эффекторной функции и/или противовоспалительной активности. Соответственно, в одном варианте осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит Fc-участок с измененным гликозилированием аминокислотных остатков для изменения цитотоксических и/или противовоспалительных свойств Tn3-каркасных структур.

Топологии Tn3-каркасной структуры

[0299] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут быть слиты с C-концом Fc-доменов, легкими цепями антитела и тяжелыми цепями антитела в любом подходящем пространственном расположении. См., *например*, международную публикацию PCT/US2011/032184 для подробного описания топологий предусмотренных каркасных структур.

Получение каркасных структур по настоящему изобретению

[0300] Tn3-каркасные структуры, описанные в данном документе, могут быть использованы в любой методике для создания новых или улучшенных мишень-связывающих белков. В одном конкретном варианте осуществления мишень является иммобилизированной на твердой подложке, такой как смола для колоночной хроматографии или лунка титровального микроплашета, и мишень контактировала с библиотекой кандидатных связывающих белков на основе каркасной структуры. Такая библиотека может состоять из клонов, сконструированных из Tn3-каркасной структуры, посредством рандомизации последовательности и/или длины CDR-подобных петель.

[0301] В связи с этим, бактериофаговый (фаговый) дисплей является одной хорошо известной методикой, которая позволяет осуществлять скрининг больших олигопептидных библиотек для идентификации представителя(ей) из данных библиотек, которые способны специфически связываться с мишенью. Фаговый дисплей представляет собой методику, с помощью которой варианты полипептиды представляют в качестве белков слияния с белком оболочки на поверхности частиц бактериофага (Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). Биоинформационные подходы можно

использовать для определения длины петли и предпочтительных характеристик
 variability встречающихся в природе FnIII-доменов. При помощи этого анализа
 предпочтительные характеристики для длины петли и variability
 последовательности можно использовать для разработки подхода "рандомизация с
 5 ограничением". При данной рандомизации с ограничением предпочтительные
 характеристики относительной длины петли и последовательности предусмотрены для
 разработки стратегии библиотеки. Включение анализа длины петли и variability
 последовательности в разработку библиотеки дает в результате рандомизацию с
 ограничением (*т.е.* определенные положения в рандомизированной петле ограничены
 10 в том, что определенная аминокислота может находиться в таком положении).

[0302] Настоящее изобретение также предлагает рекомбинантные библиотеки,
 включающие разнообразные популяции не встречающихся в природе Tn3-каркасных
 структур. В одном варианте осуществления библиотеки включают не встречающиеся
 в природе Tn3-каркасные структуры, содержащие множество доменов с бета-цепями,
 15 связанными со множеством петлевых участков, где в один или несколько указанных
 петлевых участков вносят изменения путем делеции, замены или добавления по меньшей
 мере одной аминокислоты. В конкретном варианте осуществления библиотеки включают
 Tn3-каркасные структуры, полученные из Tn3-каркасной структуры дикого типа.

[0303] Как подробно описано выше, петли, соединяющие различные бета-цепи
 20 каркасных структур, можно рандомизировать по длине и/или variability
 последовательности. В одном варианте осуществления библиотеки по настоящему
 изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, имеющие по меньшей мере одну
 петлю, которая рандомизирована по длине и/или variability последовательности.
 В одном варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по
 25 меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей
 мере шесть петель Tn3-каркасных структур рандомизированы по длине и/или
 variability последовательности. В одном варианте осуществления по меньшей
 мере одна петля сохранена неизменной, тогда как по меньшей мере одна дополнительная
 петля рандомизирована по длине и/или variability последовательности. В другом
 30 варианте осуществления по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли
 AB, CD и EF сохранены неизменными, тогда как по меньшей мере одна, по меньшей
 мере две или все три петли BC, DE и FG рандомизированы по длине и variability
 последовательности. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна, по
 меньшей мере две или по меньшей мере все три петли AB, CD и EF рандомизированы,
 35 тогда как по меньшей мере одна, по меньшей мере две или все три петли BC, DE и FG
 рандомизированы по длине и/или variability последовательности.

[0304] В конкретном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению
 содержат FnIII-каркасные структуры, где бета-цепь A содержит SEQ ID NO: 10 или 11,
 бета-цепь B содержит SEQ ID NO: 12, бета-цепь C содержит SEQ ID NO: 13 или 14, бета-
 40 цепь D содержит SEQ ID NO: 15, бета-цепь E содержит SEQ ID NO: 16, бета-цепь F
 содержит SEQ ID NO: 17, и бета-цепь G содержит SEQ ID NO: 18.

[0305] В конкретном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению
 содержат FnIII-каркасные структуры, где бета-цепь A состоит из SEQ ID NO: 10 или 11,
 бета-цепь B состоит из SEQ ID NO: 12, бета-цепь C состоит из SEQ ID NO: 13 или 14,
 45 бета-цепь D состоит из SEQ ID NO: 15, бета-цепь E состоит из SEQ ID NO: 16, бета-цепь
 F состоит из SEQ ID NO: 17, и бета-цепь G состоит из SEQ ID NO: 18.

[0306] В конкретном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению
 содержат FnIII-каркасные структуры, где бета-цепь A практически состоит из SEQ ID

NO: 10 или 11, бета-цепь В практически состоит из SEQ ID NO: 12, бета-цепь С практически состоит из SEQ ID NO: 13 или 14, бета-цепь D практически состоит из SEQ ID NO: 15, бета-цепь E практически состоит из SEQ ID NO: 16, бета-цепь F практически состоит из SEQ ID NO: 17, и бета-цепь G практически состоит из SEQ ID NO: 18.

- 5 [0307] Как подробно описано выше, один или несколько остатков в пределах петли оставлены неизменными, тогда как другие остатки рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности. Необязательно или в качестве альтернативы, один или несколько остатков в пределах петли ограничены заранее определенным и ограниченным числом различных аминокислот, тогда как другие остатки
- 10 рандомизированы по длине и/или вариабельности последовательности. Соответственно, библиотеки по настоящему изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, которые могут содержать одну или несколько петель, имеющих вырожденную консенсусную последовательность и/или один или несколько инвариантных аминокислотных остатков. В другом варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат
- 15 Tn3-каркасные структуры, имеющие петли BC, которые являются рандомизированными. В другом варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, имеющие петли BC, которые являются рандомизированными. В еще одном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, имеющие петли BC, которые являются рандомизированными.
- 20 [0308] В одном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, имеющие петли DE, которые являются рандомизированными. В одном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат Tn3-каркасные структуры, имеющие петли FG, которые являются рандомизированными. В другом варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат FnIII-каркасные структуры, имеющие петли FG, которые являются рандомизированными.
- 25

[0309] В конкретном варианте осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат каркасные структуры, причем каркасные структуры содержат аминокислотную последовательность:

- 30 IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT,
где
(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG, соответственно;
(b) X₁ представляет собой аминокислотный остаток A или T; и
35 (c) длина петли *n* представляет собой целое число от 2 до 26.

[0310] В некоторых вариантах осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению, содержащие аминокислотную последовательность:

- 40 IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀A
X₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167),
где
(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или лейцин (L);
45 (b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);
(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), изолейцин (I), валин (V), фенилаланин (F) или триптофан (W);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A), глицин (G), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), глутамин (Q), серин (S), аспарагиновую кислоту (D) или аспарагин (N);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I), валин (V), гистидин (H), глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), триптофан (W) или валин (V);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), метионин (M) или гистидин (H);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток триптофан (W) или гистидин (H); и

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток аргинин (R) или серин (S).

[0311] В некоторых вариантах осуществления библиотеки по настоящему изобретению содержат CD40L-специфичные Tn3-мономерные субъединицы по настоящему изобретению, содержащие аминокислотную последовательность:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELEX₁₁YGIKDVPDRTTIDLX₁₂X

₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTXY₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171),

где

(a) X₁ представляет собой аминокислотный остаток лизин (K) или глутаминовую кислоту (E);

(b) X₂ представляет собой аминокислотный остаток треонин (T) или изолейцин (I);

(c) X₃ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N) или аланин (A);

(d) X₄ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), лейцин (L), аланин (A), фенилаланин (F) или тирозин (Y);

(e) X₅ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), аланин (A), глицин (G), валин (V), изолейцин (I) или серин (S);

(f) X₆ представляет собой аминокислотный остаток тирозин (Y), серин (S), аланин (A) или гистидин (H);

(g) X₇ представляет собой аминокислотный остаток аспарагин (N), аспарагиновую кислоту (D), гистидин (H) или тирозин (Y);

(h) X₈ представляет собой аминокислотный остаток лейцин (L), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(i) X₉ представляет собой аминокислотный остаток гистидин (H), пролин (P), серин (S), лейцин (L) или аспарагиновую кислоту (D);

(j) X₁₀ представляет собой аминокислотный остаток глицин (G), фенилаланин (F), гистидин (H) или тирозин (Y);

(k) X₁₁ представляет собой аминокислотный остаток аланин (A) или треонин (T);

(l) X₁₂ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), аспарагин (N),
глутаминовую кислоту (E), аспарагин (R) или аспарагиновую кислоту (D);

(m) X₁₃ представляет собой аминокислотный остаток серин (S), глутамин (Q), треонин
(T), аспарагин (N) или аланин (A);

(n) X₁₄ представляет собой аминокислотный остаток пролин (P), валин (V), изолейцин
(I) или аланин (A) или не является аминокислотой;

(o) X₁₅ представляет собой аминокислотный остаток изолейцин (I) или не является
аминокислотой;

(p) X₁₆ представляет собой аминокислотный остаток глутаминовую кислоту (E) или
лизин (K); и

(q) X₁₇ представляет собой аминокислотный остаток серин (S) или аспарагин (N).

[0312] Настоящее изобретение дополнительно предлагает способы для
идентифицирования рекомбинантной Tn3-каркасной структуры, которая связывает
мишень, *например*, CD40L, и характеризуется повышенной стабильностью или
улучшенным воздействием на мишень, *например*, CD40L при сравнении с исходной
Tn3-каркасной структурой, путем скрининга библиотек по настоящему изобретению.

[0313] В конкретных вариантах осуществления способ для идентифицирования
рекомбинантной Tn3-каркасной структуры, имеющей повышенную стабильность белка
по сравнению с исходной Tn3-каркасной структурой, и специфично связывающей
мишень, предусматривает

[0314] приведение в контакт лиганда-мишени с библиотекой по настоящему
изобретению при условиях, подходящих для образования комплекса каркасная
структура:лиганд-мишень;

[0315] получение из комплекса каркасной структуры, которая связывает лиганд-
мишень;

[0316] определение, является ли стабильность каркасной структуры, полученной на
этапе (b), большей, чем у Tn3-каркасной структуры дикого типа.

[0317] Тот же способ можно использовать для идентификации рекомбинантной Tn3-
каркасной структуры с улучшенной аффинностью связывания, авидностью и т.д в
отношении мишени. В одном варианте осуществления на этапе (a) библиотеку каркасных
структур по настоящему изобретению инкубируют с иммобилизированной мишенью. В
одном варианте осуществления на этапе (b) комплекс каркасная структура:лиганд-
мишень отмывают для удаления неспецифических связывающих веществ, и наиболее
устойчивые связывающие вещества элюируют при очень жестких условиях, и
осуществляют ПЦР для получения информации о последовательности. Специально
предусмотрено, что связывающие вещества и/или информация о последовательности,
полученные на этапе (b), могут быть использованы для создания новой библиотеки с
использованием способов, раскрытых в данном документе, или известных специалисту
в данной области техники, которые могут быть использованы для повтора способа
отбора с или без дополнительного введения мутации в последовательность. В некоторых
вариантах осуществления количество циклов отбора можно проводить до получения
связывающих веществ с достаточной аффинностью к антигену.

[0318] Дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения является
накопление молекул выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей библиотеку,
содержащую каркасные структуры по настоящему изобретению, как описано выше.

[0319] Каркасные структуры по настоящему изобретению можно подвергнуть

созреванию аффинности. При данном способе, принятом в данной области техники, специфический связывающий белок подвергают процедуре, при которой осуществляется отбор по повышенной аффинности к специфичной мишени (см. Wu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(11):6037-42). Полученные в результате каркасные структуры настоящего изобретения могут проявлять по меньшей мере настолько же высокие характеристики связывания по сравнению с каркасными структурами перед созревaniem аффинности.

[0320] Настоящее изобретение также предлагает способы идентификации аминокислотной последовательности, кодирующей белок каркасной структуры, способной связываться с мишенью с тем, чтобы образовывать комплекс каркасная структура:мишень. В одном варианте осуществления данный способ предусматривает (а) приведение в контакт библиотеки настоящего изобретения с иммобилизированной или отделяемой мишенью; (b) отделение комплексов каркасная структура:мишень от свободных каркасных структур; (с) инициирование репликации отделенных каркасных структур из (b) с тем, чтобы привести к образованию новой полипептидной библиотеки дисплея, отличной от таковой в (а), при наличии пониженной вариативности и будучи обогащенной в представленных каркасных структурах, способных к связыванию мишени; d) необязательного повтора этапов (а) и (b) с новой библиотекой из (с); и е) определение последовательности нуклеиновых кислот участка, кодирующего представленную каркасную структуру вида из (d), и, следовательно, установление последовательности пептидов, способной связываться с мишенью.

[0321] В другом варианте осуществления Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения можно дополнительно рандомизировать после идентификации в скринированной библиотеке. В одном варианте осуществления способы настоящего изобретения включают дополнительное рандомизирование по меньшей мере одной, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести петель из каркасной структуры, идентифицированной в библиотеке, с использованием способа, описанного в данном документе. В другом варианте осуществления дополнительно рандомизированную каркасную структуру подвергают следующему способу идентификации каркасной структуры, способной к связыванию мишени. Данный способ включает (а) приведение в контакт дополнительно рандомизированной каркасной структуры с иммобилизированной или отделяемой мишенью, (b) отделение комплексов дополнительно рандомизированная каркасная структура:мишень от свободных каркасных структур, (с) инициирование репликации отделенных каркасных структур из (b), необязательный повтор этапов (а)-(с), и (d) определение последовательности нуклеиновых кислот участка, кодирующего указанную дополнительно рандомизированную каркасную структуру, и, следовательно, установление последовательности пептидов, способной связываться с мишенью.

[0322] В дополнительном варианте осуществления дополнительно рандомизированные каркасные структуры содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть рандомизированных петель, которые предварительно рандомизировали в первой библиотеке. В альтернативном дополнительном варианте осуществления дополнительно рандомизированные каркасные структуры содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть рандомизированных петель, которые не были предварительно рандомизированы в первой библиотеке.

[0323] Настоящее изобретение также предлагает способ получения по меньшей мере двух Tn3-каркасных структур, которые связываются с по меньшей мере одной или несколькими мишенями. Данный способ позволяет проводить скрининг средств, которые совместно воздействуют для активации определенного ответа. Может быть

5 преимущественным использование такого скрининга, когда необходима активность агонистов, требующая кооперативного взаимодействия более чем одной каркасной структуры. Данный способ позволяет проводить скрининг кооперативно взаимодействующих средств с суммарной активностью без изменения формата библиотеки с образованием мультимерных комплексов. В одном варианте осуществления

10 способ настоящего изобретения включает приведение в контакт лиганда-мишени с библиотекой настоящего изобретения при условиях, которые позволяют формироваться комплексу каркасная структура:лиганд-мишень, приводя в контакт указанные каркасные структуры со средством для перекрестного связывания (определено как средство, которое приводит в непосредственную близость по меньшей мере идентичные или

15 отличающиеся каркасные структуры), где перекрестное связывание каркасных структур активирует поддающийся детекции ответ и получение из комплекса указанных каркасных структур, которые связывают мишень. В дополнительном варианте осуществления средство для перекрестного связывания представляет собой специфичное к каркасной структуре антитело или его фрагмент, специфичное к эпитопной метке антитело или

20 его фрагмент, домен димеризации, такой как Fc-участок, суперспиральный мотив (например, но не ограничивая, "лейциновая застежка"), химическое перекрестно-сшивающее средство или другой домен димеризации, известный в данной области.

[0324] Настоящее изобретение также предлагает способы детектирования соединения, использующего Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению. Исходя из

25 специфичностей связывания Tn3-каркасных структур, полученных с помощью скрининга библиотеки, возможным является использование таких Tn3-каркасных структур в анализах для детекции специфичной мишени в образце, таких как диагностические способы. В одном варианте осуществления данный способ детектирования соединения включает приведение в контакт указанного соединения в образце с Tn3-каркасной

30 структурой настоящего изобретения при условиях, которые позволяют формирование комплекса соединение: каркасная структура и детектирование каркасной структуры, тем самым детектируя указанное соединение в образце. В дополнительных вариантах осуществления каркасную структуру метят (*т.е.* радиоизотопная метка, флуоресцентная, связанная с ферментом или колориметрическая метка) для облегчения обнаружения

35 соединения.

[0325] Настоящее изобретение также предлагает способы фиксации соединения, использующего Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению. Исходя из специфичностей связывания Tn3-каркасных структур, полученных с помощью скрининга библиотеки, возможным является использование таких Tn3-каркасных структур в

40 анализах для связывания специфичной мишени в образце, таких как для способов очистки. В одном варианте осуществления данный способ связывания соединения включает приведение в контакт указанного соединения в образце с каркасной структурой по настоящему изобретению при условиях, которые позволяют образование комплекса

соединение: каркасная структура и удаление данного комплекса из образца, тем самым

45 обеспечивая связывание указанного соединения в указанном образце. В дополнительных вариантах осуществления Tn3-каркасная структура является иммобилизированной для облегчения удаления комплекса соединение:каркасная структура.

[0326] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры, выделенные

из библиотек настоящего изобретения, содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более рандомизированных петель. В некоторых вариантах осуществления выделенные петлевые последовательности Tn3-каркасной структуры можно переместить из донорной каркасной структуры в любую петлю принимающей FnIII-каркасной структуры, включая, но не ограничивая, принимающую Tn3-каркасную структуру (например, петлевую последовательность FG из донорной каркасной структуры можно переместить из донорной каркасной структуры в любую петлю в принимающей FnIII-каркасной структуре). В конкретных вариантах осуществления выделенные петлевые последовательности можно переместить в когнатную петлю в принимающей каркасной структуре (например, петлевую последовательность FG из донорной каркасной структуры можно переместить в принимающую FnIII-каркасную структуру в положение петли FG). В некоторых вариантах осуществления выделенные петлевые последовательности могут быть "перемешаны и совмещены" случайным образом с различным принимающими каркасными структурами.

[0327] В других вариантах осуществления выделенные последовательности, кодирующие Tn3-каркасные структуры, можно идентифицировать с помощью петлевой последовательности. Например, библиотеку используют для реакции связывания с определенной мишенью и выделяют коллекцию специфических связывающих веществ. Рандомизированные петлевые последовательности могут характеризоваться как специфичные последовательности, независимо от окружения Tn3-каркасной структуры (*т.е.* каркасная структура, которая связывает мишень X, где указанная каркасная структура содержит петлевую последовательность FG из SEQ ID NO:X). В альтернативных вариантах осуществления, где каркасная структура имеет петлевые последовательности, которые связывают мишень X, петлевые последовательности могут характеризоваться как связывающие мишень X в отсутствие последовательности каркасной структуры. Иными словами, предполагается, что каркасные структуры, выделенные из библиотеки, которые связывают конкретную мишень, могут экспрессироваться в виде переменных последовательностей петли, которые связывают ту мишень, независимую от остова каркасной структуры. Данный процесс будет аналогичен концепции CDR в переменных участках антител.

Созревание аффинности

[0328] Разработка Tn3-каркасных структур настоящего изобретения может включать один или несколько этапов созревания аффинности *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления Tn3-мономерные субъединицы могут подвергнуть одиночному этапу созревания аффинности. В других вариантах осуществления Tn3-мономерные субъединицы можно подвергнуть двум или более этапам созревания аффинности. Может использоваться любой подход созревания аффинности, что в результате приводит, как правило, к аминокислотным изменениям в исходной Tn3-каркасной структуре, или, более конкретно, к аминокислотным изменениям в петлях исходной Tn3-каркасной структуры, что улучшает связывание Tn3-каркасной структуры со зрелой аффинностью с необходимым антигеном.

[0329] Данных аминокислотных изменений можно, например, достигнуть посредством случайного мутагенеза, "прогонного" мутагенеза и "сканирующего" мутагенеза. Подобный мутагенез может быть достигнут использованием, например, ПЦР с использованием ошибающейся полимеразы, штаммов-"мутаторов" дрожжей или бактерий, внедрение случайных или определенных замен в нуклеиновых кислотах во время *ab initio* синтеза все или части связывающей молекулы на основе FnIII. Способы

осуществления созревания аффинности и/или мутагенеза описаны, например, в патентах США №№ 7195880; 6951725; 7078197; 7022479; 5922545; 5830721; 5605793, 5830650; 6194550; 6699658; 7063943; 5866344 и РСТ публикации WO06023144.

[0330] Такие способы созревания аффинности могут дополнительно требовать того, чтобы жесткость антиген-связывающего скринингового исследования повышали для отбора Tn3-каркасных структур с улучшенной аффинностью к антигену. Принятые в данной области техники способы повышения жесткости анализа белок-белкового взаимодействия, можно использовать в данном случае. В одном варианте осуществления одно или несколько условия для анализа варьируют (например, концентрация солей в буфере для анализа) для уменьшения аффинности Tn3-каркасной структуры к требуемому антигену. В другом варианте осуществления период времени, который дает возможность Tn3-каркасной структуре связываться с требуемым антигеном, сокращен.

[0331] В другом варианте осуществления к анализу белок-белкового взаимодействия может быть добавлен этап конкурентного связывания. Например, сперва дают возможность Tn3-каркасной структуре связаться с требуемым иммобилизованным антигеном. Затем добавляют неиммобилизованный антиген в определенной концентрации, который служит в качестве конкурента за связывание с иммобилизованным антигеном, чтобы таким образом Tn3-каркасные структуры с наиболее низкой аффинностью к антигену извлекать из иммобилизованного антигена, что приводит к отбору Tn3-каркасных структур с улучшенной антиген-связывающей аффинностью. Жесткость условий анализа можно дополнительно повысить путем увеличения концентрации неиммобилизованного антигена, который добавляют в анализ.

[0332] Способы скрининга также могут требовать множества циклов отбора для обогащения одной или нескольких Tn3-каркасных структур улучшенным антиген-связыванием. В одном варианте осуществления в каждом цикле отбора дополнительные аминокислотные мутации вводят в Tn3-каркасную структуру. В другом варианте осуществления в каждом цикле отбора жесткость связывания с требуемым антигеном повышают для отбора Tn3-каркасных структур с повышенной аффинностью к антигену.

[0333] В некоторых вариантах осуществления созревание аффинности осуществляют путем насыщающего мутагенеза частей петель BC, DE и FG из Tn3. В некоторых вариантах осуществления насыщающий мутагенез проводят с использованием мутагенеза по Кункелю. В других вариантах осуществления насыщающий мутагенез проводят с использованием ПЦР.

[0334] В некоторых вариантах осуществления используют по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более пяти циклов созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления насыщающий мутагенез применяют относительно только одной петли, тогда как в некоторых других вариантах осуществления только одну петлю или часть петли подвергают мутации на протяжении одного цикла созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления более чем одну петлю или части одной или нескольких петель подвергают мутации на протяжении одного цикла созревания аффинности.

[0335] В других вариантах осуществления петли BC, DE и FG одновременно подвергают мутации на протяжении одного и того же цикла созревания аффинности.

[0336] В случае мономеров для сборки в мультимерной Tn3-каркасной структуре, связывающейся с различными эпитопами одной и той же мишени, каждую специфичность

связывания можно независимо подвергнуть скринингу.

[0337] В некоторых вариантах осуществления петли рандомизируют с использованием библиотеки фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления связывание Tn3-каркасной структуры с требуемой мишенью можно определить, используя способы, принятые в данной области техники. Также аминокислотные последовательности Tn3-каркасных структур, идентифицированные в скринингах, можно определять, используя способы, принятые в данной области техники.

[0338] В некоторых вариантах осуществления мономерные каркасные структуры со зрелой аффинностью по настоящему изобретению проявляют повышенную аффинности к CD40L в по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 40 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 80 раз или по меньшей мере 100 раз или более по сравнению с той же самой Tn3-каркасной структурой до созреванием аффинности, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с помощью других анализов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления мономерные каркасные структуры со зрелой аффинностью по настоящему изобретению имеют константу диссоциации (K_d) менее 5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 500 мкМ, менее 250 мкМ, менее 100 мкМ или менее 50 мкМ, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с помощью других анализов, известных в данной области техники.

[0339] Данные способы созревания аффинности можно использовать для разработки Tn3-каркасных структур с требуемыми улучшенными свойствами связывания, такими как повышенная аффинность или другими требуемыми характеристиками, такими как благоприятные фармакокинетические свойства, высокая активность, низкая иммуногенность, повышенная или пониженная перекрестная реактивность и т.д.

Получение tandemных повторов

[0340] Связывание tandemных конструкторов, димера, образованного путем связывания двух CD40L-специфичных мономерных субъединиц, может быть получено путем лигирования олигонуклеотидов в сайтах рестрикции с использованием рестриктаз, известных в данной области техники, включая, но без ограничения, рестриктазы типа II и типа IIS.

[0341] Мультимерные Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут содержать линкер на С-конце и/или N-конце и/или между доменами, как описано в данном документе. Дополнительно, каркасные структуры настоящего изобретения содержат по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или более полипептидов, при этом каркасные структуры могут быть слитыми или конъюгированными с доменом димеризации, включая, но без ограничения, фрагмент антитела, выбранный из следующего:

(i) Fab фрагмент, имеющий VL-, CL-, VH- и CH1-домены;

(ii) Fab' фрагмент, который представляет собой Fab фрагмент, имеющий один или несколько остатков цистеина на С-конце CH1-домена;

(iii) Fd фрагмент, имеющий VH- и CH1-домены;

(iv) Fd' фрагмент, имеющий VH- и CH1-домены и один или несколько остатков цистеина на С-конце CH1-домена;

(v) Fv фрагмент, имеющий VL- и VH-домены одного плеча антитела;

(vi) dAb фрагмент, который состоит из VH-домена;

(vii) выделенные CDR-участки;

(viii) F(ab')₂ фрагменты, бивалентный фрагмент, включающий два Fab' фрагмента,

соединенных посредством дисульфидного мостика в шарнирной области;

(ix) молекулы одноцепочечных антител (например, одноцепочечный Fv; scFv);

(x) "диатело" с двумя антиген-связывающими сайтами, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же самой полипептидной цепи;

(xi) "линейное антитело", содержащее пару tandemных Fd-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антиген-связывающих участков;

(xii) полноразмерное антитело; и

(xiii) Fc участок, содержащий CH2-CH3, который может дополнительно содержать все или часть шарнирного участка и/или CH1-участок.

Получение Tn3-каркасной структуры

[0342] Рекомбинантная экспрессия Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению требует конструирования вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует Tn3-каркасную структуру. Как только был получен полинуклеотид, кодирующий Tn3-каркасную структуру, вектор для получения Tn3-каркасной структуры может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК, используя методики, хорошо известные в данной области техники. Таким образом, способы получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего Tn3-каркасную структуру, кодирующую нуклеотидную последовательность, описаны в данном документе.

Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательность, кодирующую полипептиды каркасных структур, и соответствующие сигналы регуляции транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, *in vitro* методики рекомбинантных ДНК, методики синтеза и *in vivo* генетическую рекомбинацию. Настоящее изобретение, таким образом, предлагает реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую Tn3-каркасную структуру настоящего изобретения, функционально связанную с промотором.

[0343] Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяина с помощью стандартных методик, и трансфицированные клетки затем культивируют с помощью стандартных методик с получением Tn3-каркасной структуры настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение включает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий каркасную структуру настоящего изобретения, функционально связанную с гетерологичным промотором. Пригодные клетки-хозяева включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие бактерии (*например, E. coli* и *B. subtilis*).

[0344] Множество систем экспрессии хозяин-вектор могут быть использованы для экспрессии Tn3-каркасных структур настоящего изобретения. Такие системы экспрессии хозяин-вектор представляют собой носители, с помощью которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, можно получать и впоследствии очищать, но также представляют собой клетки, которые могут, будучи трансформированными или трансфицированными с помощью подходящих нуклеотидных кодирующих последовательностей, экспрессируют каркасную структуру по настоящему изобретению *in situ*. Такие включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (*например, E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии на основе ДНК рекомбинантного бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие каркасную структуру, или системы на основе клеток млекопитающих (*например, клетки COS, CHO, BHK, 293, NSO и 3T3*).

[0345] Раскрыты способы, пригодные для получения Tn3-каркасной структуры

настоящего изобретения, например, в международной патентной публикации № WO 2009/058379. Как только была получена каркасная структура настоящего изобретения путем рекомбинантной экспрессии, она может быть очищена с помощью любого способа, известного в данной области техники, для очистки белка.

5 [0346] В некоторых вариантах осуществления каркасные структуры настоящего изобретения можно получить в негликозилированной форме путем замещения аминокислотных остатков, которые могут быть гликозилированы во время рекомбинантной экспрессии. В одном конкретном варианте осуществления аминокислоты серин в линкере глицин-серин (*например*, SEQ ID NO: 131 или SEQ ID
10 NO: 132) можно заменить на другие аминокислотные остатки, такие как аланин, глицин, лейцин, изолейцин или валин (смотри, *например*, SEQ ID NO: 140, 141, 142 и 143) для предупреждения гликозилирования во время рекомбинантной экспрессии. В некоторых конкретных вариантах осуществления сайт N-гликозилирования удаляют из Tn3-каркасных структур настоящего изобретения. В других вариантах осуществления
15 каркасную структуру настоящего изобретения можно дегликозилировать после рекомбинантной экспрессии. Способы дегликозилирования *in vitro* после рекомбинантной экспрессии с использованием, *например*, ферментных смесей известны в данной области техники (например, наборы для дегликозилирования PFGase F, Enodo F Multi, Orela O-linked Glycan Release, Enzymatic CarboRelease и Enzymatic DeGlycoMx,
20 поставляемые QA-bio, Палм-Дезерт, Калифорния).

[0347] Получение Tn3-каркасных структур настоящего изобретения в научно-исследовательской лаборатории можно увеличить в масштабе для получения каркасных структур в реакторах аналитического масштаба или реакторах промышленного масштаба, как описано в публикации патента США № 2010-0298541 A1.

25 Масштабируемое производство секретированных Tn3-каркасных структур

[0348] Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения могут быть получены внутриклеточно или в виде секретированной формы. В некоторых вариантах осуществления секретированные каркасные структуры надлежащим образом уложены и полностью функциональны. Tn3 каркасные структуры настоящего изобретения можно
30 получить с помощью масштабируемого способа. В некоторых вариантах осуществления каркасные структуры могут быть получены с помощью масштабируемого способа настоящего изобретения в научно-исследовательской лаборатории, при котором может быть увеличен масштаб для получения Tn3-каркасных структур настоящего изобретения в биореакторах аналитического масштаба (например, но не ограничивая 5 л, 10 л, 15
35 л, 30 л или 50 л биореакторах). В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры могут быть получены с помощью масштабируемого способа настоящего изобретения в научно-исследовательской лаборатории, при котором может быть увеличен масштаб для получения Tn3-каркасных структур настоящего изобретения в биореакторах промышленного масштаба (например, но не ограничивая, 75 л, 100 л,
40 150 л, 300 л или 500 л). В некоторых вариантах осуществления масштабируемый способ настоящего изобретения в результате приводит к небольшому уменьшению или не приводит к уменьшению эффективности производства в сравнении со способом получения, выполненном в научно-исследовательской лаборатории.

Линкеры

45 [0349] Мономерные субъединицы в мультимерной Tn3-каркасной структуре могут быть соединены белковыми и/или небелковыми линкерами, где каждый линкер является слитым по меньшей мере с двумя мономерными субъединицами. Подходящий линкер может состоять из белкового линкера, небелкового линкера и их комбинаций.

Комбинации линкеров могут быть гомомерными или гетеромерными. В некоторых вариантах осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура настоящего изобретения содержит множество мономерных субъединиц, где все линкеры идентичны. В других вариантах осуществления мультимерная Tn3-каркасная структура содержит

5 множество мономерных субъединиц, где по меньшей мере один из линкеров функционально или структурно отличается от остальных линкеров. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут сами по себе содействовать активности мультимерной Tn3-каркасной структуры путем непосредственного или опосредованного участия в связывании с мишенью.

10 [0350] В некоторых вариантах осуществления белковый линкер представляет собой полипептид. Линкер-полипептид должен иметь длину, которая достаточна для связывания двух или более мономерных субъединиц таким способом, что они предполагают правильную конформацию относительно друг друга, сохраняя таким образом требуемую активность.

15 [0351] В одном варианте осуществления полипептидный линкер содержит от 1 до приблизительно 1000 аминокислотных остатков, от 1 до приблизительно 50 аминокислотных остатков, 1-25 аминокислотных остатков, 1-20 аминокислотных остатков, 1-15 аминокислотных остатков, 1-10 аминокислотных остатков, 1-5 аминокислотных остатков, 1-3 аминокислотных остатков. Настоящее изобретение

20 дополнительно предлагает нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, РНК или комбинации и той, и другой, кодирующие последовательность полипептидного линкера.

Аминокислотные остатки, выбранные для включения в полипептидный линкер, должны проявлять свойства, которые существенно не затрагивают активность или функцию мультимерной Tn3-каркасной структуры настоящего изобретения. Таким образом,

25 полипептидный линкер должен в целом не проявлять заряд, который был бы несовместим с активностью или функцией Tn3-мультимерной каркасной структуры настоящего изобретения, или затрагивать внутренние укладки, или образовывать связи или другие взаимодействия с аминокислотными остатками в одной или нескольких мономерных субъединицах, которые бы серьезно препятствовали связыванию

30 мультимерной Tn3-каркасной структуры настоящего изобретения с CD40L.

[0352] Использование встречающихся в природе, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные полипептиды слияния хорошо известно в литературе. Соответственно, линкеры, обеспечивающие слияние двух или более мономерных субъединиц, представляют собой природные линкеры,

35 искусственные линкеры или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности всех пептидных линкеров, представленных в Tn3-мультимерной каркасной структуре настоящего изобретения, являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности по меньшей мере двух из пептидных линкеров, представленных в мультимерной Tn3-каркасной

40 структуре настоящего изобретения, являются различными.

[0353] В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер обладает конформационной гибкостью. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептидного линкера содержит аминокислотную последовательность $(G-G-G-G-X)_m$, где X представляет собой аланин (A), серин (S),

45 глицин (G), изолейцин (I), лейцин (L) или валин (V) и m представляет собой положительное целое число (смотри, например, SEQ ID NO: 209). В конкретном варианте осуществления последовательность полипептидного линкера содержит аминокислотную последовательность $(G-G-G-G-S)_m$, где m представляет собой положительное целое

число (смотри, *например*, SEQ ID NO: 147). В другом конкретном варианте осуществления последовательность полипептидного линкера содержит аминокислотную последовательность (G-G-G-G-G)_m, где m представляет собой положительное целое число (смотри, *например*, SEQ ID NO: 148). В еще одном конкретном варианте осуществления последовательность полипептидного линкера содержит аминокислотную последовательность (G-G-G-G-A)_m, где m представляет собой положительное целое число (смотри, *например*, SEQ ID NO: 149). В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой по своей природе неструктурированный природный или искусственный полипептид (смотри, *например*, Schellenberger *et al.*, Nature Biotechnol. 27:1186-1190, 2009; смотри также Sickmeier *et al.*, Nucleic Acids Res. 35: D786-93, 2007).

[0354] Пептидный линкер может быть модифицирован таким способом, что вводится аминокислотный остаток, содержащий присоединенную группу для неполипептидного фрагмента. Примером таких аминокислотных остатков может быть остаток цистеина (к которому в дальнейшем присоединяется неполипептидный фрагмент), или аминокислотная последовательность может включать *in vivo* сайт N-гликозилирования (тем самым присоединяя остаток сахара (*in vivo*) к пептидному линкеру).

[0355] В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные последовательности всех пептидных линкеров, представленных в полипептидном мультимере, являются идентичными. В качестве альтернативы, аминокислотные последовательности всех пептидных линкеров, представленных в полипептидном мультимере, являются различными.

Мечение или конъюгирование Tn3-каркасных структур

[0356] Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения можно использовать в неконъюгированной форме или конъюгированной по меньшей мере с одним из ряда гетерологичных фрагментов для облегчения обнаружения мишени, для диагностической визуализации или терапии. При проведении очистки Tn3-каркасные структуры могут быть мечеными или конъюгированными либо перед, либо после очистки.

[0357] Многие гетерологичные фрагменты не имеют в достаточном количестве подходящих функциональных групп, с которыми Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения могут быть соединены. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления эффекторная молекула присоединена к каркасной структуре посредством линкера, где данный линкер содержит реакционноспособные группы для конъюгирования. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент, конъюгированный с Tn3-каркасной структурой настоящего изобретения, может выполнять функцию линкера. В других вариантах осуществления фрагмент является конъюгированным с Tn3-каркасной структурой через линкер, который может быть расщепляемым или нерасщепляемым. В одном варианте осуществления расщепляемая связывающая молекула представляет собой расщепляемую при изменении окислительно-восстановительного потенциала связывающую молекулу, вследствие чего связывающая молекула расщепляется в средах с более низким окислительно-восстановительным потенциалом, таких как цитоплазма и другие участки с более высокими концентрациями молекул со свободными сульфгидрильными группами. Примеры соединяющих молекул, которые могут расщепляться в результате изменения окислительно-восстановительного потенциала, включают такие, которые содержат дисульфиды.

[0358] В некоторых вариантах осуществления, Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения сконструированы для обеспечения реакционноспособных групп для конъюгирования. В таких каркасных структурах N-конец и/или C-конец служит для

обеспечения реакционноспособных групп для конъюгирования. В других вариантах осуществления N-конец может быть конъюгированным с одним фрагментом (таким как, но без ограничения, PEG), тогда как C-конец является конъюгированным с другим фрагментом (таким как, но без ограничения, биотин) или наоборот.

5 [0359] Выражение "полиэтиленгликоль" или "PEG" означает соединение полиэтиленгликоля или его производное с или без связывающих средств, связывающих или активирующих фрагментов (*например*, с тиоловым, трифлатовым, трезилатовым, азиридиновым, оксирановым, N-гидроксисукцинимидным или малеинимидным фрагментом). Выражение "PEG" предназначено для обозначения полиэтиленгликоля с молекулярной массой от 500 до 150000 Да, в том числе его аналогов, где, к примеру, 10 концевую OH-группу заменяли метоксигруппой (обозначен как mPEG).

[0360] Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения могут быть дериватизированы полиэтиленгликолем (PEG). PEG представляет собой линейный, водорастворимый полимер из повторяющихся единиц этиленоксида с двумя концевыми 15 гидроксильными группами. PEG классифицируют по их молекулярным массам, которые, как правило, варьируют от приблизительно 500 дальтон до приблизительно 40000 дальтон. В конкретном варианте осуществления используемые PEG имеют молекулярные массы в пределах от 5000 дальтон до приблизительно 20000 дальтон. PEG, связанные с каркасными структурами настоящего изобретения, могут быть либо разветвленными, 20 либо неразветвленными. Смотри, например, Monfardini, C. *et al.* 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69. PEG являются коммерчески доступными от Nektar Inc., Sigma Chemical Co. и других компаний. Такие PEG включают, но без ограничения, монометоксиполиэтиленгликоль (MePEG-OH), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинат (MePEG-S), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинимидилсукцинат (MePEG-S- NHS), 25 монометоксиполиэтиленгликоль-амин (MePEG-NH₂), монометоксиполиэтиленгликоль-трезилат (MePEG-TRES) и монометоксиполиэтиленгликоль-имидазолилкарбонил (MePEG-IM).

[0361] Вкратце, гидрофильный полимер, который используют, например, PEG, кэпируют на одном конце нереакционноспособной группой, такой как метокси или 30 этокси группа. Затем полимер активируют на другом конце реакцией с подходящим активирующим средством, таким как циануровые галогениды (например, циануровый хлорид, бромид или фторид), карбонилимидазол, ангидридный реактив (например, дигалогенсукциновый ангидрид, такой как дибромсукциновый ангидрид), ацилазид, п-дiazонийбензиловый эфир, 3-(п-дiazонийфенокси)-2-гидроксипропиловый эфир) и тому 35 подобные. Активированный полимер затем вступает в реакцию с полипептидом, как описано в данном документе, для получения полипептида, дериватизированного с полимером. В качестве альтернативы, функциональная группа в Tn3-каркасных структурах настоящего изобретения может быть активирована для реакции с полимером, или две группы могут быть соединены в согласованной реакции сочетания, используя 40 известные способы сочетания. Будет легко понять, что полипептиды настоящего изобретения могут быть дериватизированы с PEG, используя большое число других реакционных схем известных и используемых специалистами в данной области техники. PEG может быть соединен с каркасной структурой настоящего изобретения в одной или нескольких функциональных группах либо на конце Tn3-каркасной структуры, 45 либо внутри Tn3-каркасной структуры. В конкретных вариантах осуществления PEG присоединен либо на N-конце, либо на C-конце.

[0362] В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры настоящего изобретения, их аналоги или производные могут быть конъюгированными с

диагностическим или рентгеноконтрастным средством. Такие Tn3-каркасные структуры могут быть пригодны для мониторинга или прогнозирования развития или прогрессирования заболевания как части процедуры клинического испытания, такой как определение эффективности конкретной терапии.

- 5 [0363] Настоящее изобретение дополнительно охватывает применения Tn3-каркасных структур, конъюгированных с терапевтическим фрагментом. Tn3-каркасная структура может быть конъюгирована с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, *например*, цитостатик или средство, разрушающее клетки, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла, *например*, вещество, излучающее альфа-частицы.
- 10 Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным для клеток.

Анализ Tn3-каркасных структур

- [0364] Аффинность связывания и другие свойства связывания каркасной структуры Tn3 с антигеном можно определить с помощью разнообразных способов анализа *in vitro*, известных в данной области техники, в том числе, например, равновесных способов (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или кинетического анализа (например, анализа BIACORE®)) и других способов, таких как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного связывания, гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В этих и других способах может быть
- 15 задействована метка на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или могут использоваться разнообразные способы выявления, в том числе, без ограничений, с применением хромогенных, флуоресцентных, люминесцентных или изотопных меток. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999).

- 25 [0365] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению специфически связываются с мишенью при специфических кинетических показателях. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению могут характеризоваться константой диссоциации или K_d (k_{off}/k_{on}), составляющей менее 1×10^{-2} М, 1×10^{-3} М, 1×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М, 1×10^{-13} М, 1×10^{-14} М или менее 1×10^{-15} М. В конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению характеризуются K_d ,
- 30 составляющей 500 мкМ, 100 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ или менее, определенной в анализе BIAcore® или в других анализах, известных в данной области техники.

- [0366] В альтернативном варианте осуществления аффинность каркасных структур Tn3 по настоящему изобретению описывается относительно константы ассоциации (K_a), вычисляемой как отношение k_{on}/k_{off} , которая составляет по меньшей мере
- 40 1×10^2 М⁻¹, 1×10^3 М⁻¹, 1×10^4 М⁻¹, 1×10^5 М⁻¹, 1×10^6 М⁻¹, 1×10^7 М⁻¹, 1×10^8 М⁻¹, 1×10^9 М⁻¹, 1×10^{10} М⁻¹, 1×10^{11} М⁻¹, 1×10^{12} М⁻¹, 1×10^{13} М⁻¹, 1×10^{14} М⁻¹, 1×10^{15} М⁻¹ или по меньшей мере 5×10^{15} М⁻¹.

- 45 [0367] В определенных вариантах осуществления скорость, с которой происходит диссоциация комплекса каркасных структур Tn3 по настоящему изобретению и целевого эпитопа, может быть более значимой, чем величина K_d или K_a . В некоторых вариантах осуществления каркасные структуры Tn3 по настоящему изобретению характеризуются

k_{off} , составляющей менее 10^{-3} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-4} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-5} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-6} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-7} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-8} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-8} \text{ с}^{-1}$, менее 10^{-9} с^{-1} , менее $5 \times 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ или менее 10^{-10} с^{-1} .

5 [0368] В определенных других вариантах осуществления скорость, с которой происходит ассоциация комплекса каркасных структур Tn3 по настоящему изобретению и целевого эпитопа, может быть более значимой, чем величина K_d или K_a . В этом случае каркасные структуры Tn3 по настоящему изобретению связываются с мишенью при
10 скорости k_{on} , составляющей по меньшей мере $10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, или по меньшей мере $10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, или по меньшей мере $10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

15 [0369] Каркасные структуры Tn3 по настоящему изобретению могут также быть прикреплены к твердым подложкам, которые в особенности пригодны для иммунологических анализов или очищения целевого антигена. Такие твердые подложки включают, без ограничений, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

20 CD40L-специфичные Tn3-каркасные структуры

[0370] Настоящее изобретение предлагает Tn3-каркасные структуры, специфически связывающиеся с CD40L. В конкретных вариантах осуществления каркасные структуры по настоящему изобретению специфически связываются с CD40L человека. В других
25 конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению связываются с гомологами CD40L от мыши, курицы, макака-резуса, макака-крабоеда, крысы или кролика. В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению связываются с доступным эпитопом CD40L. Такие варианты осуществления предусматривают CD40L, эндогенная экспрессия которого происходит в клетках, и/или клетки, подвергнутые трансфекции в целях
30 эктопической экспрессии рецептора.

[0371] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению распознают эпитопы, экспонируемые на мономерном CD40L. В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению распознают эпитопы, экспонируемые на тримерной форме CD40L. В
35 других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению распознают эпитопы, экспонируемые на CD40L, связанном с мембраной. В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению распознают эпитопы, экспонируемые на растворимом CD40L.

[0372] В еще одних вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению связываются с мономерным CD40L и предупреждают олигомеризацию молекул CD40L или препятствуют ей. В еще одних вариантах осуществления каркасные структуры по настоящему изобретению ослабляют или ингибируют взаимодействие CD40L с CD40. В других вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению оказывают агонистическое влияние на передачу сигналов в
45 клетке, опосредованную CD40L. В еще одних вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению оказывают антагонистическое влияние на передачу сигналов в клетке, опосредованную CD40L.

[0373] Настоящее изобретение также предлагает способы модулирования активности

CD40L при помощи Tn3-каркасных структур, описываемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают приведение CD40L в контакт с CD40L-специфичными каркасными структурами и блокирование взаимодействия между CD40 и CD40L. В других вариантах осуществления

5 способы по настоящему изобретению включают приведение клетки, в которой происходит экспрессия CD40L, в контакт с CD40L-специфичной каркасной структурой Tn3 и предупреждение протеолитического отщепления CD40L от поверхности клетки. В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают

10 приведение мономерного CD40L в контакт с CD40L-специфичной Tn3-каркасной структурой и предупреждение олигомеризации CD40L. В других вариантах осуществления димеризации или олигомеризации CD40L можно достичь посредством применения мультимерных Tn3-каркасных структур.

[0374] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению предусматривают введение CD40L-специфичной каркасной структуры, которая ослабляет

15 CD40-опосредованный иммунный ответ (см., например, Elqueta *et al.* 229: 152-172, 2009) или ингибирует путь передачи сигналов в нисходящем направлении, инициируемый связыванием CD40 с CD40L, что измеряется с помощью обычных анализов, известных в данной области техники.

[0375] Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что

20 CD40L-специфичные каркасные структуры по настоящему изобретению могут функционировать путем предупреждения связывания CD40L с CD40, путем связывания и блокирования растворимого CD40L, путем изменения характера взаимодействия CD40L с CD40, но не предотвращения связывания, путем предотвращения или усиления опосредованного металлопротеиназами ферментативного отщепления CD40L от

25 поверхности клетки с получением растворимого CD40L, путем предотвращения или усиления эндоцитоза, опосредованного CD40L на поверхности клетки, и т.д.

Последовательности, специфически связывающиеся с CD40L

[0376] В некоторых вариантах осуществления Tn3-каркасная структура по настоящему изобретению содержит CD40L-специфичные мономерные субъединицы, содержащие

30 по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть петлевых последовательностей, которые связываются с CD40L.

[0377] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере

35 три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть петлевых последовательностей мономерных клонов, связывающихся с CD40L, выбранных из: 309 (исходный клон из семейства 309, выделенный из наивной библиотеки Tn3; SEQ ID NO: 20), 309FGwt (исходный клон 309 с гуманизированной FG-петлей; SEQ ID NO: 22), 340 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 24), 341 (клон 309 с

40 созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 26), 342 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 146), 343 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 30), 344 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 32), 345 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 34), 346 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 36), 347 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 38), 348 (клон 309 с созревшей

45 аффинностью; SEQ ID NO: 40), 349 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 42), 311 (исходный клон из семейства 311, выделенный из наивной библиотеки Tn3; SEQ ID NO: 44), 311K4E (вариант клона из семейства 311 из первого цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 46); 311K4E_1 (вариант клона из семейства 311 из второго

цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 48), 311K4E_2 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 50), 311K4E_3 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 52), 311K4E_4 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 54), 311K4E_5 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 56), 311K4E_7 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 58), 311K4E_8 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 60), 311K4E_9 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 62), 311K4E_10 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 64), 311K4E_11 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 66), 311K4E_12 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 68), 311K4E_13 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 70), 311K4E_14 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 72), 311K4E_15 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 74), 311K4E_16 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 76), 311K4E_19 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 78), 311K4E_20 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 80) и 311K4E_21 (вариант клона из семейства 311 из второго цикла созревания аффинности; SEQ ID NO: 82).

[0378] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат по меньшей мере одну петлевую последовательность, выбранную из петлевых последовательностей, перечисленных в Таблице 2. В других вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат по меньшей мере одну последовательность петли ВС, выбранную из последовательностей петли ВС, перечисленных в Таблице 2. В других вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат по меньшей мере одну последовательность петли DE, выбранную из последовательностей петли DE, перечисленных в Таблице 2. В других вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат по меньшей мере одну последовательность петли FG, выбранную из последовательностей петли FG, перечисленных в Таблице 2.

[0379] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат последовательность петли ВС, выбранную из последовательностей петли ВС, перечисленных в Таблице 2; и последовательность петли DE, выбранную из последовательностей петли DE, перечисленных в Таблице 2. В других вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат последовательность петли ВС, выбранную из последовательностей петли ВС, перечисленных в Таблице 2; и последовательность петли FG, выбранную из последовательностей петли FG, перечисленных в Таблице 2. В других вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат последовательность петли DE, выбранную из последовательностей петли DE, перечисленных в Таблице 2; и последовательность петли FG, выбранную из последовательностей петли FG, перечисленных в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичные мономерные субъединицы содержат петлевые последовательности, соответствующие петлевым последовательностям одного, двух или трех различных клонов Tn3.

[0380] В конкретных вариантах осуществления, в случае, если последовательность

CD40L-специфичной мономерной каркасной структуры содержит линкер и/или гистидиновую метку (например, His-8-метку) на С-конце последовательности или дополнительные N-концевые аминокислоты, этот С-концевой линкер и/или гистидиновую метку и дополнительные N-концевые аминокислоты можно удалить, при этом

5 соответствующая аминокислотная последовательность содержит, таким образом, делецию последовательностей С-концевого линкера и His-метки и N-концевой дополнительной аминокислоты или аминокислот.

[0381] В некоторых вариантах осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну мономерную субъединицу, например, последовательность

10 клона 342 (клон 309 с созревшей аффинностью; SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 146). В других вариантах осуществления CD40L-специфичная каркасная структура содержит более одной мономерной субъединицы, например, две мономерные субъединицы клона 342 (SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 146) в tandem (см., например, SEQ ID NO: 135). В конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему

15 изобретению конъюгированы с вариантом HSA (см., например, SEQ ID NO: 134 и SEQ ID NO: 135). В дополнительных вариантах осуществления HSA может быть конъюгированным с N-концом или с С-концом мультимерной Tn3-каркасной структуры.

[0382] В конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну мономерную субъединицу 311K4E_12, линкер GS и вариант

20 C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 201). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну мономерную субъединицу 311K4E_12 с вариантом CELTYG бета-цепи С, линкером, полностью состоящим из остатков глицина, и вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 202). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная

25 Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 311K4E_12 в tandem и два линкера GS, где один линкер GS соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер GS соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 203). В еще одном конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 311K4E_12 в tandem и два линкера, полностью

30 состоящих из остатков глицина, где один линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 204).

[0383] В одном конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 309, соединенные в tandem посредством

35 линкера GS (см., например, SEQ ID NO: 205). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну субъединицу 309, соединенную с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 206). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура

40 содержит две субъединицы 309 в tandem и два линкера GS, где один линкер GS соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер GS соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 207).

[0384] В конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну мономерную субъединицу 342, линкер GS и вариант C34S

45 HSA (см., например, SEQ ID NO: 134). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит одну мономерную субъединицу 342, линкер, полностью состоящий из остатков глицина, и вариант C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 144). В другом конкретном варианте осуществления CD40L-

специфичная Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 342 в тандеме и два линкера GS, где один линкер GS соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер GS соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 135).

В еще одном конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 342 в тандеме и два линкера, полностью состоящих из остатков глицина, где один линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 145). В еще одном конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит две субъединицы 342, соединенные в тандем посредством линкера GS (см., например, SEQ ID NO: 208).

[0385] В другом конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит субъединицу 311 или субъединицу, происходящую из 311 (например, 311K4E_12), и субъединицу 309 или субъединицу, происходящую из 309 (например, 342), в тандеме и два линкера GS, где один линкер GS соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер GS соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 135). В еще одном конкретном варианте осуществления CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура содержит субъединицу 311 или субъединицу, происходящую из 311 (например, 311K4E_12), и субъединицу 309 или субъединицу, происходящую из 309 (например, 342), в тандеме и два линкера, полностью состоящих из остатков глицина, где один линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет субъединицы друг с другом, а второй линкер, полностью состоящий из остатков глицина, соединяет одну субъединицу с вариантом C34S HSA (см., например, SEQ ID NO: 145).

[0386] Примеры CD40L-специфичных тандемных бивалентных Tn3-каркасных структур и конструкторов слияния на основе сывороточного альбумина (SA) показаны на Фиг. 2А (также см. фиг. 9А). Хотя конкретные линкеры представлены на Фиг. 2А, рассматриваются и другие линкеры, представленные в данном документе. Хотя можно применять зрелый SA дикого типа, например, мышинный сывороточный альбумин (MSA) или человеческий сывороточный альбумин (HSA), предполагается, что один или несколько аминокислотных остатков цистеина (C) в зрелом SA могут быть заменены, например, на серин (S), аланин (A), глицин (G) и т.д.

[0387] Типичные конструкторы показаны ниже. Последовательность SA подчеркнута. Линкеры заключены в рамку. Будет понятно, что многочисленные изменения находятся в пределах объема настоящего изобретения. Например, линкеры могут быть изменены (некоторые неограничивающие примеры представлены в данном документе), первые один или два N-концевых аминокислотных остатка (SQ) могут отсутствовать и/или быть заменены на альтернативные аминокислотные остатки, может быть включена метка (например, 6xHis-метка), альтернативные CD40L-специфичные каркасные структуры (например, таковые на основе 10-го домена Fn3 фибронектина) можно использовать в подобном конструкторе, и т.д.

Моновалентный 342—HSA, конструктор 1 (SEQ ID NO: 134),

[мономерный 342]-(G₄S)₂ линкер-HSA_{C34S}

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
 HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK
 FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
 ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
 FLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
 NLIKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR
 MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKE
 TCFAEEGKKLVAAASQAALGL

Моновалентный 342—HSA, конструктор 2 (SEQ ID NO: 144),

[мономерный 342]-G₁₀ линкер-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQEPERNECFLQHKKDDNPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
 HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQK
 FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
 ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
 FLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
 NLIKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR
 MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKE
 TCFAEEGKKLVAAASQAALGL

Бивалентный 342—HSA, конструктор 1 (SEQ ID NO: 135),

[мономерный 342]-линкер (G₄S)₃-[мономерный 342]-линкер (G₄S)₂-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSGDMS
 NPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 CFLQHKDDNPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR
 YKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGGERAFKAWAVARLS
 QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
 YSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQGEY
 KFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQ
 AALGL

Бивалентный 342—HSA, конструктор 2 (SEQ ID NO: 145),

[мономерный 342]-линкер G₁₅-[мономерный 342]-линкер G₁₀-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSILICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSILICRSGDMS
 SNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQOSPFDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 5 CFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFAKR
 YKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
 QRFPAEFAEVSCLVTDLTKECHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
 YSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLELFEQLGE
 YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
 10 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADKETCFAEEGKKLVAASQ
 AALGL

Моновалентный 311K4E_12—HSA, конструктор 1 (SEQ ID NO: 201),

[мономерный 311K4E_12]-линкер (G₄S)₂-HSA_{C34S}:

15 SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSILICLTDDGTNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
 VLIAFAQYLQOSPFDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE
 TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE
 IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCAS
 LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSCLVTDLTKECHGDLLECAADDRADLAK
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
 20 KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
 EPQNLKQNCLELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Моновалентный 311K4E_12—HSA, конструктор 2 (SEQ ID NO: 202),

[мономерный 311K4E_12]-линкер G₁₀-HSA_{C34S}:

25 SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELYGIKDVPGDRTTIDLNPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSILICLTDDGTNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
 VLIAFAQYLQOSPFDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE
 TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE
 30 IARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCAS
 LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSCLVTDLTKECHGDLLECAADDRADLAK
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
 KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
 EPQNLKQNCLELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 35 NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Бивалентный 311K4E_12—HSA, конструктор 1 (SEQ ID NO: 203),

[мономерный 311K4E_12]-линкер G₄S₃-[мономерный 311K4E_12]-линкер
 (G₄S)₂-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVDTTALITWTRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPQYVHYSIGNLK
PDTEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGSRLDAPSQIEVEDVDTT
ALITWTRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPQYVHYSIGNLKPDTEYEVSLICL
TTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECFLQHKKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPEL
LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAW
AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY
ARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AEEGKK
LVAASQAALGL

Бивалентный 311K4E_12—HSA, конструктор 2 (SEQ ID NO: 204),

[мономерный 311K4E_12]-линкер G₁₅-[мономерный 311K4E_12]-линкер G₁₀-HSA_{C34S}:

S Q I E V E D V T D T T A L I T W T N R S S Y S N L H G C E L T Y G I K D V P G D R T T I D L N Q P Y V H Y S I G N L K
 P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y N N P A K E T F T T **GGGGGGGGGGGGGGGG** R L D A P S Q I E V D V T D T T
 A L I T W T N R S S Y S N L H G C E L A Y G I K D V P G D R T T I D L N Q P Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L
 T T D G T Y N N P A K E T F T T **GGGGGGGGGG** D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K A L V L I A F A Q Y L Q O S
P F E D H V K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L R E T Y G E M A D C C A K Q
E P E R N E C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y E I A R R H P Y F Y A P E L
L F F A K R Y K A A F T E C C Q A A D K A A C L L P K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C A S L Q K F G E R A F K A W
A V A R L S Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L A K Y I C E N Q D S I S S K
L K E C C E K P L L E K S H C I A E V E N D E M P A D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A E A K D V F L G M F L Y E Y
A R R H P D Y S V V L L L R L A K T Y E T T L E K C C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L V E E P Q N L I K Q N C E L
F E Q L G E Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H P E A K R M P C A E D Y L S
V V L N Q L C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K E F N A E T F T F H A D I C
T L S E K E R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K A D D K E T C F A E E G K K
 L V A A S Q A A L G L

Фармацевтические композиции

[0388] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает композицию, например, без ограничений, фармацевтическую композицию, содержащую одну Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению или комбинацию таковых, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одну Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению или комбинацию из, например, без ограничения, двух или более различных таковых. Например, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать комбинацию Tn3-каркасных структур, которые связываются с различными эпитопами целевого антигена или которые характеризуются взаимодополняющими активностями. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит одну мономерную Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит мультимерную Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению. В еще одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит димерную Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению.

[0389] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно вводить при комбинированной терапии, как, например, в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать применение Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению в комбинации по меньшей мере с одним другим видом терапии, где терапия может представлять собой иммунотерапию, химиотерапию, лучевую терапию или фармакотерапию. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать одну или несколько фармацевтически

приемлемых солей.

Способы применения каркасных структур

[0390] Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению обладают диагностической и терапевтической значимостью в условиях *in vitro* и *in vivo*. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*, или субъекту, например, *in vivo*, для лечения, предупреждения или диагностики разнообразных нарушений.

[0391] Настоящее изобретение также предлагает способы применения Tn3-каркасных структур по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также охватывает применение Tn3-каркасных структур по настоящему изобретению для предупреждения, диагностики, управления проявлением, лечения или уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеваниями, нарушениями, обусловленными заболеваниями, или нарушениями, включая, без ограничений, раковые, воспалительные и аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания, в отдельности или в комбинации с другими видами терапии. Настоящее изобретение также охватывает применение Tn3-каркасных структур по настоящему изобретению, конъюгированных или слитых с фрагментом (например, терапевтическим средством или лекарственным средством), для предупреждения, управления проявлением, лечения или уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеваниями, нарушениями или инфекциями, включая, без ограничений, раковые, воспалительные и аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания, в отдельности или в комбинации с другими видами терапии.

[0392] Настоящее изобретение также предлагает способы нацеливания на эпитоп, трудные для осуществления с традиционными антителами. Например, в одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению можно применять для первоначального нацеливания на прилегающий антиген, и во время связывания другой связывающий домен может вступать в контакт с криптантигеном.

[0393] Настоящее изобретение также предлагает способы применения Tn3-каркасных структур для сближения клеток различных типов. В одном варианте осуществления белки по настоящему изобретению могут связываться с целевой клеткой посредством одного связывающего домена и рекрутировать другую клетку посредством другого связывающего домена. В другом варианте осуществления первая клетка может представлять собой раковую клетку, а вторая клетка представляет собой эффекторную клетку иммунной системы, такую как НК-клетка. В другом варианте осуществления можно применять Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению для укрепления взаимодействия между двумя различными клетками, такими как антиген-презентирующая клетка и Т-клетка, с возможным усилением иммунного ответа.

[0394] Настоящее изобретение также предлагает способы применения каркасных структур Tn3 для элиминации клеток из популяции. В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению пригодны для элиминации клеток следующих типов: эозинофилы, базофилы, нейтрофилы, Т-клетки, В-клетки, мастоциты, моноциты и опухолевые клетки.

[0395] Настоящее изобретение также предлагает способы применения Tn3-каркасных структур в качестве диагностических реагентов. Такие диагностические реагенты можно применять для тестирования в отношении наличия или отсутствия CD40L, наличия рецептора CD40, эффективности связывания CD40L с рецептором CD40, свободного CD40L у пациента, свободного CD40L в образце или CD40L, связанного с рецептором CD40 в образце.

[0396] Тn3-каркасные структуры по настоящему изобретению и композиции, содержащие их, пригодны для многих целей, например, в качестве терапевтических средств против широкого диапазона хронических и острых заболеваний и нарушений, включая, без ограничений, аутоиммунные и/или воспалительные заболевания.

5 Композиции и способы настоящего изобретения, описанные в данном документе, пригодны для предупреждения или лечения аутоиммунных нарушений и/или воспалительных нарушений.

[0397] Примеры аутоиммунных и/или воспалительных нарушений включают, без ограничений, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунные заболевания надпочечников, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунные оофорит и орхит, синдром Шегрена, псориаз, атеросклероз, диабетическую и другие формы ретинопатии, ретролентальную фиброплазию, возрастную макулярную дегенерацию, неоваскулярную глаукому, формы гемангиомы, формы тиреоидной гиперплазии (в том числе болезнь Грейвса), трансплантацию ткани роговицы и другой ткани, а также хроническое воспаление, сепсис, ревматоидный артрит, перитонит, болезнь Крона, реперфузионное повреждение, септицемию, эндотоксический шок, муковисцидоз, эндокардит, псориаз, артрит (например, псориатический артрит), анафилактический шок, ишемию органа, реперфузионное повреждение, повреждение спинного мозга и отторжение аллотрансплантата, аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, дерматит, связанный с целиакией-спру, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, CREST-синдром, болезнь холодовых агглютининов, болезнь Крона, дискоидную волчанку, идиопатическую криоглобулинемию смешанного типа, фибромиалгию/ фибромиозит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический фиброз легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), IgA-нейропатию, болезнь Стилла, красный плоский лишай, красную волчанку, болезнь Менъера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа или иммуноопосредованный сахарный диабет, миастению, вульгарный пемфигус, пернициозную анемию, нодозный полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, болезнь Рейно, синдром Рейтера, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системную красную волчанку, красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/ гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, васкулит, такой как герпетический дерматит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

[0398] Примеры воспалительных заболеваний включают, без ограничений, астму, энцефалит, воспалительные заболевания кишечника, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), аллергические нарушения, септический шок, фиброз легких, недифференцированную спондилоартропатию, недифференцированную артропатию, артрит, воспалительный остеолит и хроническое воспаление, возникающее в результате хронических вирусных или бактериальных инфекций. Композиции и способы по настоящему изобретению можно применять с одним или несколькими видами традиционной терапии, применяемыми для предупреждения, управления течением или лечения вышеупомянутых заболеваний.

[0399] Настоящее изобретение предлагает способы предупреждения, управления

течением, лечения или уменьшения интенсивности раковых, аутоиммунных, воспалительных или инфекционных заболеваний или одного или нескольких их симптомов, при этом указанные способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или нескольких каркасных структур Tn3 по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, которые не являются терапевтическими средствами против рака (также называемые средствами терапии заболеваний, не относящихся к раковым).

[0400] Примеры таких средств включают, без ограничений, противорвотные средства, противогрибковые средства, антибактериальные средства, такие как антибиотики, противовоспалительные средства и противовирусные средства. Неограничивающие примеры противорвотных средств включают метопимазин и метоклопрамид. Неограничивающие примеры противогрибковых средств включают азольные лекарственные средства, имидазол, триазолы, полиен, амфотерицин и пиримидин. Неограничивающие примеры антибактериальных средств включают дактиномицин, блеомицин, эритромицин, пенициллин, митрамицин, цефалоспорин, имипенем, азтреонам, ванкомицин, циклосерин, бацитрацин, хлорамфеникол, клиндамицин, тетрациклин, стрептомицин, тобрамицин, гентамицин, амикацин, канамицин, неомицин, спектиномицин, триметоприм, норфлоксацин, рефампин, полимиксин, амфотерицин В, нистатин, кетоконазол, изониазид, метронидазол и пентамидин. Неограничивающие примеры противовирусных средств включают аналоги нуклеозидов (например, зидовудин, ацикловир, ганцикловир, видарабин, идоксуридин, трифлуридин и рибавирин), фоскарнет, амантадин, римантадин, саквинавир, индинавир, ритонавир, интерферон ("IFN")- α , β или γ и AZT. Неограничивающие примеры противовоспалительных средств включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства ("NSAID"), стероидные противовоспалительные лекарственные средства, бета-агонисты, антихолинергические средства и метилксантины.

[0401] В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает композиции, при помощи которых возможно лечить хроническое воспаление. В одном варианте осуществления композиции пригодны для нацеливания на клетки иммунной системы для разрушения или инактивации. В одном варианте осуществления композиции пригодны для нацеливания на активированные Т-клетки, "дремлющие" Т-клетки, В-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, мастоциты или дендритные клетки. В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает композиции, способные к ослаблению функции клеток иммунной системы. В другом варианте осуществления композиции способны к нивелированию функции клеток иммунной системы.

[0402] В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает композиции, пригодные для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Каркасные структуры согласно настоящему изобретению проявляют высокий уровень стабильности в условиях низкого pH. Стабильность при низких pH позволяет предположить, что композиция будет подходящей для перорального введения при разнообразных расстройствах желудочно-кишечного тракта, таких как синдром раздраженной толстой кишки, желудочно-пищеводный рефлюкс, формы псевдонепроходимости кишечника, демпинг-синдром, устойчивая тошнота, пептическая язва, аппендицит, ишемический колит, неспецифический язвенный колит, гастрит, заболевание, вызываемое *Helicobacter pylori*, болезнь Крона, болезнь Уиппла, целиакия-спру, дивертикулит, дивертикулез, дисфагия, грыжа пищевода отверстия диафрагмы, инфекционные расстройства пищевода, икота, руминация и другие.

[0403] Настоящее изобретение дополнительно предлагает комбинированные композиции и способы применения таких композиций в предупреждении, лечении, ослаблении или уменьшении интенсивности заболевания или его симптомов. Применение Tn3-каркасных структур по настоящему изобретению можно комбинировать с видами традиционной терапии, подходящими для предупреждения, лечения, ослабления или уменьшения интенсивности заболевания или его симптомов. Приводимые в качестве примера виды традиционной терапии можно найти в Physician's Desk Reference (56th ed., 2002 и 57th ed., 2003). В некоторых вариантах осуществления применение каркасных структур Tn3 по настоящему изобретению можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, хирургическим вмешательством, иммунотерапией с помощью биологического препарата (антитела или пептида), терапией с помощью низкомолекулярных средств или другим видом терапии, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления компоненты комбинированной терапии применяют совместно. В других вариантах осуществления компоненты комбинированной терапии применяют по отдельности.

[0404] Настоящее изобретение также предлагает способы диагностирования заболеваний. Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению, которые связываются со специфичной мишенью, ассоциированной с заболеванием, можно внедрить в способ, применяемый для диагностики указанного заболевания. В одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению применяют в способе диагностики заболевания у субъекта, при этом указанный способ включает получение образца от субъекта, приведение мишени в контакт с Tn3-каркасной структурой в указанном образце в условиях, обеспечивающих возможность образования взаимодействия мишень:каркасная структура, идентификацию комплекса мишень:каркасная структура и выявление, таким образом, мишени в образце. В других вариантах осуществления заболевание, которое следует диагностировать, описано в данном документе.

[0405] Настоящее изобретение также предлагает способы визуализации специфических мишеней. В одном варианте осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению, конъюгированные с визуализирующими средствами, такими как зеленые флуоресцентные белки, другие флуоресцентные метки (Cy3, Cy5, родамин и другие), биотин или радионуклиды, можно применять в способах визуализации наличия, месторасположения или продвижения специфической мишени. В некоторых вариантах осуществления способ визуализации мишени, включающий применение Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению, осуществляют *in vitro*. В других вариантах осуществления способ визуализации мишени, включающий применение Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению, осуществляют *in vivo*. В других вариантах осуществления способ визуализации мишени, включающий применение Tn3-каркасной структуры по настоящему изобретению, осуществляют с помощью MRI, PET-сканирования, рентгенографии, флуоресцентной детекции или с помощью других способов детекции, известных в данной области техники.

[0406] Настоящее изобретение также предлагает способы контроля прогрессирования, рецидива, лечения или уменьшения интенсивности заболевания при помощи каркасных структур по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления способы контроля прогрессирования, рецидива, лечения или уменьшения интенсивности заболевания выполняют с помощью способов визуализации, диагностики или приведения в контакт соединения/мишени с Tn3-каркасной структурой по настоящему изобретению, как представлено в данном документе.

Дозировка и введение фармацевтических композиций

[0407] Для получения фармацевтических или стерильных композиций, содержащих Tn3-каркасную структуру по настоящему изобретению, каркасную структуру смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. Композиции, предназначенные для введения, предпочтительно являются апирогенными, что означает, что они практически не содержат эндотоксинов и/или связанных пирогенных веществ. Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, в том числе от скорости циркуляции объекта в сыворотке крови или ткани, уровня проявления симптомов, иммуногенности объекта и доступности клеток-мишеней в биологической среде. В конкретных вариантах осуществления схема введения максимально увеличивает количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, что согласуется с приемлемым уровнем побочных эффектов.

[0408] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения необходимого терапевтического эффекта для конкретного пациента, композиции и способа введения, которое не является токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от разнообразных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их сложных эфиров, солей или амидов, способ введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

[0409] Композицию по настоящему изобретению можно также вводить посредством одного или нескольких путей введения при помощи одного или нескольких разнообразных способов, известных в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления Tn3-каркасные структуры по настоящему изобретению можно составлять с обеспечением надлежащего распределения *in vivo*.

Эквиваленты

[0410] Специалисты в данной области признают или будут способны установить, используя не более, чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата нижеследующей формулой изобретения.

[0411] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждые отдельные публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

[0412] Настоящее изобретение теперь описано со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры являются только иллюстративными, и настоящее изобретение никоим образом не следует толковать как ограниченное этими примерами, а скорее следует толковать как охватывающее любые возможные варианты, которые становятся очевидными в результате реализации идей, изложенных в данном документе.

Пример 1

Конструирование библиотеки из 3 петель на основе исходной Tn3-каркасной структуры

[0413] Библиотеку конструировали на основе исходной Tn3-каркасной структуры,

описанной в публикации международной заявки на патент № WO 2009/058379, где она обозначена как "Tn3 SS4." Библиотека содержит рандомизированные участки петель BC, DE и FG. В данной конструкции в библиотеку Tn3 включено разнообразие охарактеризованных последовательностей и длин петель, что согласуется с характером разнообразия, описанным для природных доменов FnIII, три различных длины петель BC и FG, и применяется схема, описывающая совокупность кодонов "NHT", для внедрения разнообразия в библиотеку (H = A, T, C). По данной схеме образуют 12 кодонов, кодирующих 12/20 аминокислот (см. таблицу 3), т.е. каждый кодон кодирует уникальную аминокислоту. Более того, стоп-кодона или кодоны, кодирующие цистеин (Cys), отсутствуют.

Таблица 3

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

[0414] Разнообразие библиотеки создавали при помощи вырожденных олигонуклеотидов, показанных в Таблице 4.

Таблица 4

Олигонуклеотид	Петля	Последовательность	SEQ ID NO
BC9 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGGC TGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	178
BC11 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTNHTNHTNHTNHTNHTNHT NHTGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	179
BC12 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRRCGNHT VTNHTGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	180
DE NHT	DE	CGATCGCACCACCATAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTNHTTATAG CATTGGTAACCTGAAACCG	181
FG9 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHT NHTKCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	182
FG10 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTNHTNHTRGC NHTCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	183
FG11 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHT AGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	184

Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T.

[0415] Сборку библиотеки проводили при помощи олигонуклеотидов, показанных в Таблице 5.

Таблица 5

Олигонуклеотид	Последовательность	SEQ ID NO
BCX-DE bridge v2	CAGATCTATGGTGGTGCGATCGCCCGGCACATCTTTAATGCCAT AGGTCAGTTCACA	185
DE-FGX bridge v2	GCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGGTATCCGGTTTCAGGTTAC CAATGCTAT	186
KpnI amp rev v2	CGGGTCGGTTGGGGTACCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTT	187
KpnI reverse v2	CGGGTCGGTTGGGGTA	188
BC library amp v2	GGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACCG ATACCACCGCGCTGATTACCTGG	189

[0416] Производили сборку смеси вырожденных олигонуклеотидов (в эквимольных соотношениях олигонуклеотидов, соответствующих петлям BC и FG, соответственно),

BCX-DE bridge v2, DE-FGX bridge v2 и KpnI amp rev v2, в 20-цикловой ПЦР-реакции без избытка внешних праймеров. Данный продукт разбавляли и амплифицировали в ходе обычной ПЦР-реакции при помощи праймеров BC library amp v2 и KpnI reverse v2. Из полученного в результате продукта ПЦР создавали полный ген Tn3, который затем

5 расщепляли с помощью *NcoI* и *KpnI* и лигировали в вектор для фагового дисплея (описанный в WO 2009/058379). *E. coli* трансформировали путем введения ДНК с помощью электропорации. Конечное разнообразие библиотеки согласно оценкам составляло приблизительно $7,9 \times 10^{10}$ представителей.

10 [0417] После электропорации библиотеку инкубировали в течение 1 часа при 37°C со встряхиванием. Добавляли хелперный фаг M13KO7, и через час клетки разбавляли до большего объема и выращивали при 37°C со встряхиванием в течение ночи. На следующий день фаги удаляли и концентрировали из надосадочной жидкости путем осаждения с PEG 8000.

15 Пример 2

Пэннинг библиотек для идентификации Tn3-каркасных структур, специфичных по отношению к CD40L человека

[0418] Фаг-дисплейные библиотеки Tn3, содержащие $>10^{10}$ уникальных последовательностей, подвергали пэннингу с CD40L. Разнообразие данных библиотек

20 происходило из изменчивости последовательностей и длины петель BC, DE и FG, аналогичных трем петлям CDR в варибельном домене антитела. Селекцию лидерных белков Tn3 проводили путем пэннинга библиотек на рекомбинантных биотинилированных CD40L человека и клеточной линии CHO, в которой происходит сверхэкспрессия CD40L. Чередующиеся циклы пэннинга с этими двумя реагентами

25 применяли для обеспечения того, чтобы лидерные клоны могли распознать рекомбинантный внеклеточный домен, а также нативный CD40L, заякоренный на мембране.

[0419] Рекомбинантный CD40L человека (MegaCD40L человека; Аххора) биотинилировали с помощью сульфо-NHS-биотина EZ-Link (Pierce, Рокфорд, Иллинойс),

30 применяя реагент для биотинилирования в 5-кратном молярном избытке. После инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре образец подвергали диализу в PBS в течение ночи с удалением неконъюгированного биотина. 10 мкг биотинилированного CD40L иммобилизовали на гранулах со стрептавидином M280 (DynaI, Карлсбад, Калифорния) с последующим блокированием в PBS, содержащем 10

35 мг/мл BSA, в течение 2 часов. Поступающий материал состоял из библиотек, разработанных согласно описанному в примере 1 или, дополнительно, библиотек, разработанных при помощи стандартных методик конструирования, таких как описанные в WO 2009/058379.

[0420] Фаги блокировали в PBS, содержащем 10 мг/мл BSA, в течение 2 часов.

40 Блокированный поступающий материал добавляли к контрольным гранулам со стрептавидином M280 (без мишени) и инкубировали во встряхивателе-качалке в течение 2 часов при комнатной температуре для элиминации из библиотеки молекул, связывающихся с гранулами. Библиотеку, подвергнутую элиминации, затем добавляли к гранулам, покрытым CD40L, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной

45 температуре на качающейся платформе. После трех промываний с помощью PBST (PBS + 0,1% Tween) для удаления несвязанных фагов гранулы добавляли к клеткам XL-1 Blue *E. coli* в экспоненциальной фазе роста, которые затем совместно инфицировали хелперным фагом M13KO7 в 60 мл среды 2хYT, содержащей 50 мкг/мл карбенициллина.

После выращивания в течение ночи при 37°C со встряхиванием фаги собирали путем осаждения с PEG из суточной культуральной среды.

[0421] Второй цикл пэннинга (цикл 2) проводили на клеточной линии CHO, в которой происходит сверхэкспрессия CD40L. Фаговую библиотеку блокировали в 3% BSA/PBS с покачиванием при комнатной температуре в течение 1 часа. Клетки разделяли с помощью Accutase (Invitrogen), промывали 2х с помощью 5 мл PBS, и 10⁷ клеток блокировали в 1 мл 3% BSA/PBS с покачиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Блокированные клетки осаждали на центрифуге при 500 x g в течение 5 минут, аккуратно ресуспендировали в растворе блокированной фаговой библиотеки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Несвязанные фаги удаляли путем аккуратного промывания клеток 3 раза в 1 мл 3% BSA/PBS и один раз в PBS, осаждая клетки путем центрифугирования при 500 x g в течение 5 минут в микроцентрифуге и с использованием новых пробирок Eppendorf для каждого промывания. Клеточный осадок непосредственно добавляли к XL-1 Blue *E. coli* в экспоненциальной фазе роста, которые затем обрабатывали согласно описанному для цикла 1.

[0422] Цикл 3 пэннинга проводили согласно описанному для цикла 1, за исключением того, что связанные фаги элюировали путем добавления 100 мМ HCl с последующей нейтрализацией с помощью 1М Tris-HCl, pH 8. Элюированный нейтрализованный фаг применяли для инфицирования клеток XL1 Blue *E. coli* согласно описанному для цикла 1.

[0423] Цикл 4 пэннинга также выполняли на клетках согласно описанному для цикла 2, за исключением того, что производили 5 промываний в 3% BSA/PBS. Цикл 5 осуществляли при помощи 5 мкг биотинилированного MegaCD40L, но в остальном согласно описанному для цикла 3.

[0424] После 5 циклов пэннинга проводили скрининг полученных в результате вариантов Tn3 в виде растворимого белка. Исходные растворы фагов, амплифицированных и осажденных с помощью PEG, применяли в ПЦР для амплификации совокупности фрагментов, охватывающей кодируемые последовательности Tn3. Эту совокупность фрагментов расщепляли с помощью *NcoI* + *KpnI* и клонировали в соответствующие сайты *NcoI*-*KpnI* плазмиды pSec-oppA(L25M)-Tn3 (см., например, WO 2009/058379). В самоиндуцирующую среду MagicMedia (Invitrogen), содержащую карбенициллин (100 мкг/мл), в 96-луночных планшетах с глубокими лунками инокулировали клетки BL21 DE3 *E. coli*, трансформированные с помощью конструкторов, происходящих из pSec-oppA(L25M)-Tn3. Культуры выращивали в течение 18 часов, встряхивая при 37°C, и клетки отделяли от среды путем центрифугирования. Среду, содержащую секретируемые растворимые варианты Tn3, применяли непосредственно в скрининговом анализе связывания с CD40L.

[0425] Десять наборов из 96 клонов подвергали скринингу для идентификации белков Tn3, специфически связывающихся с рекомбинантными CD40L. Вкратце, в скрининговом анализе использовали захват растворимых вариантов Tn3 с His-меткой, секретируемых в среду, посредством связывания с антителом к His, иммобилизованным в лунках микропланшетов. После захвата среду и избыточный белок вымывали, и взаимодействие между захваченными вариантами Tn3 и CD40L отслеживали путем использования биотинилированного MegaCD40L человека и измерения уровня оставшейся мишени (после промывания планшета) с помощью SA-HRP и реагентов для традиционного ELISA.

[0426] На этапе захвата иммобилизованное антитело к His насыщали с помощью

Tn3, и молярное количество захваченного Tn3 в каждой лунке становилось практически идентичным независимо от уровней экспрессии отдельных клонов. Данная нормализация уровней Tn3 давала в результате уровни в анализе, пропорциональные эффективности взаимодействия с мишенью и не подвергаемые влиянию возможных различий в уровнях экспрессии белка.

[0427] Объекты данного анализа, дающие положительный результат, секвенировали для идентификации 34 уникальных последовательностей Tn3, которые связываются с рекомбинантными CD40L. Из панели уникальных последовательностей Tn3, связывающихся с CD40L, подмножество из 24 клонов, характеризовавшихся устойчивым сигналом в анализе и удовлетворительными уровнями экспрессии, что оценивается посредством SDS-PAGE надосадочных жидкостей культуры, подвергали реэкспрессии и незначительной очистке.

[0428] Вкратце, в среду на основе супербульона, содержащую карбенициллин (100 мкг/мл) с 1% глюкозой, инокулировали клетки BL21 DE3 *E. coli*, трансформированные с помощью конструкторов, происходящих из pSec-oppA(L25M)-Tn3. Культуры выращивали при 37°C до достижения оптической плотности (O.D.) 0,5-0,8, затем индуцировали с помощью 0,2 mM IPTG. После встряхивания при 37°C в течение 5 часов клетки отделяли от среды путем центрифугирования. Очистку Tn3-каркасных структур от среды производили путем очистки на установке периодического действия с помощью Ni-NTA Superflow (Qiagen), промывания в 2х PBS с 20 mM имидазола и элюирования с помощью 2х PBS с 250 mM имидазола. Образцы подвергали диализу в PBS, и концентрации определяли по поглощению УФ-излучения при 280 нм согласно Gill and von Hippel (Anal. Biochem. 182: 319, 1989).

[0429] На основании ранжирования в анализе и поведения при SEC уровень экспрессии 8 лидерных клонов повышали, и их очищали до низкого уровня эндотоксинов (< 1 ЕЭ/мг) для тестирования в функциональном клеточном анализе.

[0430] Два клона Tn3 (обозначенные как 309 и 311) демонстрировали сходную активность в биохимическом и клеточном анализе (Фиг. 6А, 6В, 6С) и были в 3-5 раз более действенными, чем ближайший конкурирующий клон.

[0431] Моновалентные Tn3-каркасные структуры 309 и 311, специфичные по отношению к CD40L человека, уменьшали общее количество В-клеток, количество плазматических клеток и переключение классов Ig (Фиг. 6А, 6В и 6С). Фиг. 6А показан ингибирующий эффект 309 и 311 в отношении экспрессии CD86, индуцированной HuCD40L, на CD19-положительных PBMC человека, стимулированных клетками Jurkat D1.1; на Фиг. 6В показано ингибирование пролиферации В-клеток, стимулированной HuCD40L, с помощью 309 и 311; и на Фиг. 6С показано уменьшение количества плазматических клеток в совместных культурах Т/В-клеток. Также было показано, что 309 связывается с активированными первичными Т-клетками с помощью FACS (данные не показаны). PBMC стимулировали с помощью рекомбинантных MegaCD40L человека (Аххога) или клеток Jurkat, в которых происходит экспрессия CD40L человека (D1.1, ATCC), и процентную долю клеток CD19+/CD86+ измеряли с помощью FACS через 24 часа.

[0432] Лидерные клоны 309 и 311 находились в монодисперсном состоянии и не проявляли какой-либо тенденции к агрегации или образованию олигомеров высшего порядка в растворе, что определяли с помощью анализа очищенных образцов посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) (фиг. 7А).

[0433] Значения температурной стабильности лидерных клонов 309 и 311 определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с применением

образцов белка при 1 мг/мл в PBS с pH 7,2 и сравнивали с температурной стабильностью исходного белка Tn3 (фиг. 7B). Лидерные клоны 309 и 3011 характеризовались T_m , составляющей $70 \pm 1^\circ\text{C}$, которая была лишь немного более низкой, чем T_m исходного Tn3 (72°C).

[0434] Поскольку не были идентифицированы клоны, проявляющие перекрестную реактивность в отношении лигандов мыши, осуществляли способ пэннинга, подобный описанному выше, для идентификации Tn3, специфичного по отношению к лигандам мыши, обозначенного M13. M13 также демонстрировал активность в клеточном анализе РВМС (см. Фиг. 1А).

Пример 3

Оптимизация лидерных CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур

[0435] Для повышения действенности выбранных лидерных Tn3 применяли оптимизацию аффинности. В целом, проводили один или несколько циклов мутагенеза в пределах петель Tn3, контактирующих с мишенью, с селекцией улучшенных вариантов из комбинаторных фаг-дисплейных библиотек.

3.1 Перестановка в петлях

[0436] С целью определения того, какие из 3 петель в двух лидерных молекулах участвуют во взаимодействии с CD40L, создавали конструкторы, в которых каждая отдельная последовательность петли была заменена на последовательность петли исходного Tn3, обнаруживаемую в тенасине С человека. Показатели активности мутантных вариантов сравнивали с таковыми первоначальных вариантов в анализе связывания, проводимом в соответствии с описанным для скринингового анализа, описанного выше (Фиг. 10А). Для обеих лидерных молекул мутации в петлях ВС и DE приводили в результате к полной утрате связывания с CD40L, тогда как замена петли FG на последовательность исходного Tn3 не оказывала эффект (для 309), либо оказывала ограниченный эффект (311) на связывание. Таким образом, петли ВС и DE, по-видимому, содержали последовательности, несущие главную ответственность за контактирование с CD40L, и поэтому были в первую очередь выбраны для оптимизации аффинности.

3.2 Оптимизация лидерной CD40L-специфичной Tn3-каркасной структуры 309

[0437] Поскольку в эксперименте по перестановке в петлях выявили, что последовательность петли FG 309 можно заменить на последовательность петли FG исходного Tn3 без значительной утраты действенности связывания, было решено применять данный конструктор (называемый 309FGwt) в качестве остова для созревания аффинности. Это будет устранять несущественные мутации, проявляющиеся в отклонении от последовательности исходного тенасина С, в целях снижения возможного риска иммуногенности. Следует отметить, что последовательность петли FG исходного Tn3 содержала RGD-мотив, который затем устраняли путем мутации в конечных лидерных молекулах. Создавали три библиотеки петель ВС и одну библиотеку петель DE.

[0438] Для трех библиотек петель ВС выполняли три цикла ПЦР с применением вырожденных олигонуклеотидов BC9 PCR, BC 9-loop NNK и 309 BC-loop NNKdope (таблица 6) вместе с обратным праймером Kpn1 amp rev v2 (таблица 5) при помощи матрицы, происходящей из 309FGwt, в которой кодоны петли ВС были заменены на стоп-кодона. Последующая ПЦР-амплификация этих фрагментов с помощью праймеров BC library amp v2 (таблица 5) и KpnI reverse v2 давала фрагмент библиотеки Tn3 полной длины.

[0439] Для библиотеки петель DE ПЦР-амплификация с помощью DE PCR и KpnI amp reverse v2 на матрице, происходящей из 309FGwt (в которой кодоны петли DE были

заменены на стоп-кодонами), давала фрагмент, содержащий рандомизированную петлю DE и петлю FG Tn3 дикого типа, который объединяли с фрагментом, кодирующим участок Tn3 выше петли DE, образованным путем ПЦР с помощью BC library amp v2 и BCX-DE bridge v2 на матрице из 309. Два фрагмента соединяли в ходе ПЦР с перекрывающимися праймерами с помощью внешних праймеров BC library amp v2 и KpnI reverse v2.

Таблица 6. ДНК-олигонуклеотиды, применяемые для создания библиотеки 309FGwt LO

Олигонуклеотид	Последовательность	SEQ ID NO
BC9 PCR	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGA ACTGACCTATGGCATTAAAGATG	190
BC 9-loop NNK	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNNKGSTN NKNNNKNNKGGCTGTGAACCTGACCTATGGCATTAAA-3'	191
309 BC-loop NNKdope	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78 T45K44KTGTGAACCTGACCTATGGCATTAAA-3'	192
DE PCR	5'- GATGTGCCCGGGCGATCGCACCACCATAGATCTG1 11111TATAGCATTTGGTAACCTGAAACCGG-3'	193
Upstr BCloop Rev	CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT	194
BC shuffle rev	CAGATCTATGGTGGTGGCGATCGC	195
DE shuffle FWD	TGTGAACCTGACCTATGGCATTAAAGATGT	196

1= кодоны для всех 19aa(-cys) 2= кодоны для Ala/Pro 3= кодоны для Ala/Gly;

4= 70%G10%A10%C10%T 5= 10%G,70%A,10%C,10%T

6=10%G,10%A,70%C, 10%T 7= 10%G,10%A,10%C,70%T

8= 70%A15%C15%T K = 50%G/50%T

[0440] Фрагменты NcoI-KpnI клонировали в вектор для фагового дисплея, и фаговую библиотеку создавали согласно описанному в примере 1.

[0441] Четыре библиотеки по отдельности подвергали пэннингу на

биотинилированном MegaCD40L человека согласно описанному для первого цикла в примере 2 с применением 4 мкг CD40L в цикле 1 и 1 мкг в цикле 2. После амплификации фагов в выходном материале после цикла 2 одноцепочечную ДНК выделяли при помощи набора Qiagen Spin M13 (Qiagen, Валенсия, Калифорния), и пулы фрагментов, содержащих петли BC, из библиотек петель BC амплифицировали при помощи BC lib amp v2 и BC shuffle rev, а пул фрагментов, содержащих петли DE, амплифицировали из библиотеки петель DE при помощи праймеров DE-shuffle FWD и KpnI reverse v2.

Фрагменты для ПЦР очищали из геля, и проводили их сборку за счет использования их перекрывающейся последовательности при помощи внешних праймеров BC lib amp v2 и KpnI reverse v2. Полученный в результате ПЦР фрагмент применяли для создания библиотеки в фаговом векторе согласно описанному ранее. Эту библиотеку подвергали пэннингу, состоящему в общей сложности из 5 циклов, на биотинилированном MegaCD40L человека согласно описанному в примере 2, за исключением того, что вначале обеспечивали контакт библиотек с мишенью в концентрации 50 нМ, 20 нМ, 20 нМ и 10 нМ (в общем объеме 50 мкл) в ходе циклов 1-4 в течение 2 часов перед инкубированием с заблокированными магнитными гранулами со стрептавидином M280 в течение 10 минут с последующим промыванием.

[0442] Выходные образцы клонировали в пуле в сайты NcoI - KpnI плазмиды pSec-oppA(L25M)-Tn3 pSec, и шестнадцать 96-луночных планшетов подвергали скринингу в отношении связывания с CD40L при помощи растворимого белка в скрининговом анализе, описанном выше. 270 клонов с наивысшими количественными показателями тщательно отбирали, повторно анализировали и секвенировали. Десять клонов отбирали для дополнительной характеристики на основе анализа связывания и анализа последовательностей. Она включала оценивание действенности в анализе РВМС,

определение K_d в отношении связывания с CD40L в анализе с использованием биосенсоров, определение термодинамической стабильности с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и выявление тенденции к агрегации или образованию олигомеров высшего порядка в растворе с помощью анализа посредством эксклюзионной хроматографии. Результаты обобщены в таблице 7. Последовательности клонов 309 и 309FGwt, выравненные с последовательностями десяти оптимизированных клонов (обозначенных 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348 и 349), показаны на фиг. 11A и 11B.

[0443] Варианты с созревшей аффинностью демонстрировали на 1-3 порядка более высокую действенность, чем клон 309, сохраняли высокую стабильность, измеряемую с помощью DSC, и большинство из них находилось в монодисперсном состоянии, что измеряли с помощью SEC.

Таблица 7

Вариант	IC50 для PBMC (нМ)	K_d (нМ)	Профиль SEC	Tm, DSC (°C)
309	226	191	ОК	72
309FGwt	760	Нет данных	ОК	71
340	0,7	2,2	ОК	77
341	0,7	Нет данных	ОК(?)	71
342	0,7	1,4	ОК	73
343	0,6	2,0	ОК	69 (?)
344	1,3	Нет данных	ОК	(65+78,5)
345	37,3	39	ОК	72
346	9,0	14,9	ОК	71
347	11,0	10,7	ОК	70
348	1,0	1,8	?	Нет данных
349	38,2	21	ОК(?)	Нет данных

[0444] Анализы PBMC осуществляли путем стимуляции PBMC с помощью клеток Jurkat, в которых происходит экспрессия CD40L человека (D1.1, ATCC), и процентную долю клеток CD19+/CD86+ измеряли с помощью FACS через 24 часа. Данный анализ применяли для тестирования и ранжирования панели лидерных Tn3-каркасных структур, переходя к этому от установления приоритетов на основе биохимических критериев. Результаты анализов PBMC показаны на Фиг. 10B и обобщены в таблице 7.

[0445] Измерения аффинности осуществляли на матричной системе для исследования взаимодействия белков ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) с сенсорным чипом GLC при 25°C. Фосфатно-солевой буферный раствор ProteOn с 0,005% Tween 20, pH 7,4 (PBS/Tween) применяли в качестве подвижного буфера. MegaCD40L человека иммобилизовали на чипе при поверхностной плотности приблизительно 2300 резонансных единиц. Варианты Tn3 (340, 342, 343, 345, 346, 347, 348 и 349) в двукратных разведениях получали в PBS/Tween/0,5 мг/мл BSA, pH 7,4 (от 150 до 4,7 нМ). Образцы в каждой концентрации впрыскивали в шесть каналов для анализируемых веществ при скорости потока 30 мкл/мин. в течение 300 секунд. K_d определяли путем применения анализа равновесия, настройка параметров которого осуществляется в программном обеспечении ProteOn. Результаты показаны в Таблице 7.

[0446] Десять TCD40L-специфичных вариантов Tn3 анализировали в отношении стабильности с помощью DSC. Вкратце, измерения при DSC производили на VP-Capillary

DSC (MicroCal). Производили замену буфера для белков на PBS (pH 7,2) посредством обширного диализа, и их концентрацию доводили до 0,25-0,5 мг/мл для анализа по методу DSC. Образцы сканировали при 20-95°C при скорости сканирования 90°C/час без повторного сканирования. Результаты показаны в Таблице 7.

[0447] Для наилучших клонов получали улучшение IC_{50} по сравнению с 309 вплоть до 300-кратного и более чем 1000-кратное улучшение по сравнению с остовом 309FGwt, применяемым для создания библиотеки оптимизированных лидерных молекул. Семь клонов характеризовались K_d в диапазоне одноразрядных чисел нМ.

3.3 Оптимизация лидерных CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур 311

Перед проведением эксперимента с использованием петель, упомянутого ранее (см. Фиг. 10A).

[0448] была предпринята первоначальная попытка создания библиотеки оптимизированных лидерных молекул, ориентированная на внедрение разнообразия в петлю FG 311, создание и скрининг полученной в результате фаг-дисплейной библиотеки. Скрининг проводили после 4 циклов пэннинга на биотинилированном MegaCD40L человека согласно описанному ранее, и было обнаружено, что большинство положительных попаданий содержало случайную мутацию замены остатка K4 на E в N-концевом константном участке Tn3 выше петли BC. Не был выявлен явный консенсус между последовательностями положительных попаданий в петле FG. Внедрение одной мутации K4E в 311 приводило в результате к приблизительно 100-кратному повышению действенности (с приблизительно 4 мкМ до 36 нМ) в анализе РВМС (см. Фиг. 10С).

[0449] Поскольку в эксперименте по перестановке в петлях выявили, что последовательности петель BC и DE были необходимы для связывания с CD40L, эти петли затем предназначались для использования в остове 311K4E для дополнительного созревания аффинности. Создавали две отдельные библиотеки. Одна библиотека предназначалась для включения петли BC согласно стратегии, где каждый остаток с 50% вероятностью был в последовательности 311 дикого типа и с приблизительно 50% вероятностью был одним из остальных 11 остатков, кодируемых NHT. Другая библиотека включала полностью рандомизированную петлю DE из 6 остатков.

[0450] Что касается библиотеки петель BC, в ПЦР-реакциях применяли олигонуклеотиды BC11-311Gly и BC11-311NHT (таблица 8) с обратным праймером KpnI amp rev v2 (таблица 5) на матрице, происходящей из 311, в которой кодоны петли BC были заменены на стоп-кодона, с образованием фрагментов, содержащих петли BC, DE и FG. Амплификация смеси 1:1 этих фрагментов с помощью праймеров BC library amp K4E и KpnI amp rev v2 в конечном счете давала фрагмент библиотеки Tn3 полной длины.

[0451] Библиотеку петель DE создавали как библиотеку петель DE 309FGwt, описанную выше, за исключением того, что в ПЦР-реакциях применяли матрицу, происходящую из 311, и в конечной ПЦР-амплификации применяли праймер BC library amp K4E.

Таблица 8. Олигонуклеотиды, используемые для создания библиотеки оптимизированных лидерных молекул 311K4E.

Олигонуклеотид	Последовательность	SEQ ID NO
BC11-311Gly	5'- ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAATAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAATAA-3'	198
BC library amp K4E	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGGAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199
BC11-311Gly	5'- ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAATAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAATAA-3'	198
BC library amp K4E	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGGAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199

1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T

3=10%G, 10%A, 70%C, 10%T 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T

5=70%A, 15%C, 15%T 6=15%A, 70%C, 15%T

7=15%A, 15%C, 70%T V=33%A, 33%C, 33%G

H=33%A, 33%C, 33%T

[0452] Фрагменты библиотеки полной длины расщепляли с помощью NcoI и KpnI, клонировали в вектор для фагового дисплея, и фаговые библиотеки создавали согласно описанному в примере 1.

[0453] Две библиотеки по отдельности подвергали пэннингу на биотинилированном MegaCD40L человека согласно описанному в примере 1 с применением 10 мкг белка в цикле 1, 5 мкг в цикле 2 и 5 мкг в цикле 3. После амплификации фагов в выходном материале после цикла 3 одноцепочечную ДНК выделяли при помощи набора Qiagen (Qiagen, Валенсия, Калифорния), и две библиотеки подвергали шаффлингу согласно описанному для библиотек 309FGwt. После шаффлинга библиотеку подвергали пэннингу, состоящему в общей сложности из 5 циклов, на биотинилированном MegaCD40L человека согласно описанному выше для подвергнутой шаффлингу библиотеки 309FGwt, применяя 100 нМ, 20 нМ, 4 нМ, 1 нМ и 1 нМ мишени в ходе циклов 1-5.

[0454] Выходные образцы клонировали в пуле в растворимый вектор секрети согласно описанному ранее, и пять 96-луночных планшетов подвергали скринингу в отношении связывания с CD40L при помощи скринингового анализа растворимых белков, описанного ранее. Положительные попадания идентифицировали относительно сигнала, получаемого при использовании варианта-остова 311K4E. 18 уникальных клонов с наивысшими количественными показателями, обозначенные 311K4E_1, 311K4E_2, 311K4E_3, 311K4E_4, 311K4E_5, 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_9, 311K4E_10, 311K4E_11, 311K4E_12, 311K4E_13, 311K4E_14, 311K4E_15, 311K4E_16, 311K4E_19, 311K4E_20 и 311K4E_21 (последовательности, показанные на Фиг. 12А и Фиг. 12В), анализировали в качестве сырых неочищенных белков для ранжирования по скорости диссоциации. Определение оценки скорости диссоциации неочищенных Tn3-каркасных структур осуществляли на матричной системе для исследования взаимодействия белков ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) в анализе с использованием биосенсоров с CD40L, иммобилизованным на чипе. MegaCD40L человека иммобилизовали на чипе GLC (BioRad), и все варианты разбавляли до расчетной концентрации 80 нМ, впрыскивали при скорости потока 30 мкл/мин. в течение 300 секунд при времени диссоциации, установленном на 1200 секунд. В качестве буфера подвижной фазы применяли PBS, 0,005% Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7,4. Скорости диссоциации

ранжировали с помощью визуального изучения сенсограмм. Подмножество из четырех вариантов, демонстрирующих наиболее низкие скорости диссоциации, 311K4E_3, 311K4E_11, 311K4E_12 и 311K4E_15, очищали, и значения K_d определяли как составляющие от 1,1 до 6,4 нМ (Таблица 9).

Таблица 9. K_d 311K4E и 4, подвергнутых аффинной очистке вариантов, связывающихся с CD40L человека.

Вариант 311	K_d (нМ)
311K4E	18
311K4E_12	1,1
311K4E_11	6,3
311K4E_15	1,6
311K4E_3	6,4

[0455] Как указано на Фиг. 10D, понижение K_d (с 18 нМ до 1 нМ) 311K4E_12 соответствовало 12-кратному повышению действенности в анализе РВМС относительно остова 311K4E.

[0456] В заключение, операция оптимизации лидерных молекул по исходным попаданиям 309 и 311 из наивных библиотек дает одноразрядное число нМ для молекул, связывающихся с CD40L.

[0457] Подобную операцию оптимизации производили в отношении молекулы M13, специфичной по отношению к лигандам мыши (данные не показаны). Полученная в результате оптимизированная молекула, специфичная по отношению к CD40L мыши (обозначенная M31), демонстрировала приблизительно 20-кратное повышение действенности в анализе РВМС по сравнению с исходной молекулой (Фиг. 1A).

Пример 4

Экспрессия и очистка конструкторов слияния CD40L-специфичный Tn3—HSA без меток

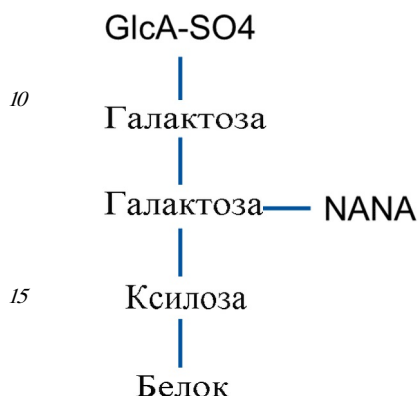
[0458] Tn3-конструкторы, слитые с HSA, описанные в общих чертах на Фиг. 2A и 9A, экспрессировали в клеточной линии млекопитающих 293F посредством транзientной трансфекции. Экспрессионные конструкторы слияния Tn3-HSA создавали на основе вектора экспрессии для млекопитающих собственного производства. Для повышения однородности продукта использовали мутантную форму HSA (обозначенную HSA C34S), в которой неспаренный частично доступный цистеин 34 в результате мутации был заменен на серин (Zhao *et al.*, 2009, Eur. J. Pharm. Biopharm. 72: 405-11).

[0459] Белок слияния можно очистить за один этап очистки с помощью ионообменной хроматографии (IEX). Пример элюирования 309-309-HSA из колонки Q-HP (GE HealthCare) с помощью солевого градиента показан на Фиг. 9B. В дополнение к основному пику наблюдались минорные более поздние пики элюирования (составляющие менее 10% общей площади пика). В анализе по методу масс-спектрометрии выявили, что материал, соответствующий этим минорным побочным пикам, был обогащен О-гликозилированными видами 309-309-HSA. Фракции, содержащие материал, соответствующий основному пику, объединяли и применяли в последующих анализах активности.

[0460] В случае очистки в более крупном масштабе этапу IEX, упомянутому выше, предшествовал захват конструкторов слияния Tn3-HSA из надосадочной жидкости культуры с помощью аффинной хроматографии с применением аффинных матриц для HSA, например, HiTrap Blue HP (GE HealthCare). После промывания белок слияния на

основе HSA можно было элюировать буфером, содержащим октиленовую кислоту. Элюат загружали в колонку Q-HP после 3-кратного разведения в фосфатном буфере.

[0461] Анализ минорного(минорных) пика(пиков) выявил наличие углеводных фрагментов с О-связями. Предположили, что О-гликан представляет собой однородную смесь углеводов, происходящую из структуры, представляющей собой О-ксилозилированное ядро, о которой сообщалось ранее (Wakabayashi et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:5436-5442) и которая показана ниже:



[0462] Было определено, что сайт преобладающего присоединения находится в линкере GGGGS между доменами Tn3. Было также обнаружено, что гликан присутствует в меньшей степени в линкере GGGGS, который находится между Tn3 и HSA. Уровни О-гликана, таким образом, были более высокими в бивалентных конструктах по сравнению с моновалентными конструктами и были более высокими в материале, вырабатываемом клетками НЕК, по сравнению с таковым в клетках CHO. Уровни также варьировали среди различных Tn3-конструктов. Таким образом, уровень О-гликана можно понизить посредством тщательного отбора клеток-хозяев, например, применения клеток CHO или других клеток, в отношении которых было обнаружено, что они вырабатывают материал с более низкими уровнями О-гликана. В дополнение, материал, содержащий О-гликан, можно удалить посредством способов очистки с получением более однородного продукта, в котором отсутствует О-гликан.

Альтернативно, линкер можно модифицировать с удалением основного(основных) сайта(сайтов) присоединения О-гликана, например, путем замены остатка Ser на Gly в результате мутации. Линкеры в некоторых конструктах можно повторно сконструировать с получением одного или нескольких линкеров GGGGG. В материале с линкером(линкерами) GGGGG не были выявлены О-гликаны какого-либо типа, и различий по активности не наблюдали (данные не показаны).

Пример 5

Увеличение периода полужизни в сыворотке CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур

[0463] Изучали слияние с сывороточным альбумином в качестве стратегии увеличения периода полужизни в сыворотке CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур. В целях определения фармакокинетических (ПК) свойств конструктов слияния Tn3, специфичный по отношению к CD40L мыши—MSA проводили ПК-анализ на мышах. Конструкты слияния на основе MSA выбирали для изучения суррогатных молекул, отдавая им преимущество перед соответствующими конструктами слияния на основе HSA, поскольку FcRn мыши связывается с HSA значительно слабее, чем он связывается с MSA, что приводит в результате к понижению рециркуляции из эндосом и, следовательно, повышению скорости циркуляции (Andersen *et al.* J. Biol. Chem. 285, 4826-4836, 2010).

[0464] Клетки НЕК 293 применяли для экспрессии tandemной бивалентной Tn3-каркасной структуры, специфичной по отношению к CD40L мыши, слитой с MSA. Наблюдали высокие уровни экспрессии (Фиг. 3А). Данные конструкторы имели линкер (G₄S) между единицами Tn3-каркасной структуры и 3 повтора (G₄S) в линкере между
 5 каркасной структурой и MSA. В дополнение, в каждую из каркасных структур M13 и M31 внедряли мутацию N49Q с удалением возможного сайта N-связанного гликозилирования. Данная мутация не влияла на действенность данных каркасных структур (данные не показаны). Через 6 дней после трансфекции уровень экспрессии оценивали как 200 мг/л. Очистку осуществляли с помощью IMAC с использованием C-концевой His-метки. Выход очищенного белка оценивали как 125 мг/л надосадочной
 10 жидкости культуры.

[0465] После слияния MSA с бивалентными каркасными структурами M13 наблюдали 8-кратное повышение действенности по сравнению с димерной каркасной структурой M13 без MSA (фиг. 3В). Бивалентная каркасная структура, содержащая M31 с созревшей
 15 аффинностью, слитая с MSA, была в 140 раз более действенной, чем соответствующая бивалентная каркасная структура M13, слитая с MSA, приблизительно в 900 раз более действенной, чем конструктор слияния моновалентный M31—MSA, и обладала действенностью, сравнимой с таковой для моноклонального антитела MR1 к CD40L мыши (Фиг. 3С).

[0466] Для определения РК-свойств конструкторов слияния CD40L-специфичный Tn3—MSA осуществляли РК-анализ на мышах. Белковые конструкторы вводили внутривенно при 10 мг/кг самкам мышей CD-1 в возрасте 5-7 недель. У каждой мыши производили забор 150 мкл крови в различные моменты времени, и с помощью анализа
 25 при помощи ELISA определяли концентрацию конструктора слияния Tn3-HSA в сыворотке крови. Вкратце, планшеты Nunc MaxiSorp покрывали антителом M2 к FLAG (Agilent), блокировали в 4% молоке в PBS+0,1% Tween (PBST) и инкубировали с MegaCD40L мыши (Аххора). MegaCD40L иммобилизовали посредством его FLAG-метки. Образцы сыворотки крови и белковые стандарты разбавляли в 4% молоке в PBST и добавляли после промывания планшета в PBST. После инкубирования планшет промывали в
 30 PBST, и для выявления конструкторов слияния Tn3-HSA применяли поликлональное антитело кролика к TN3 (Covance) при помощи антитела козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированного с HRP (Jackson ImmunoResearch), при стандартном протоколе ELISA. Концентрации в образцах сыворотки крови определяли на основе градуировочных кривых в модели линейной регрессии, образованных в ходе анализов
 35 разведения того же самого конструктора слияния Tn3-MSA. Концентрации определяли как среднее значение для 3 различных мышей.

[0467] Как видно из Фиг. 4А, M31-MSA и M13-M13-MSA характеризовались временем полужизни, составляющими 38 часов и 31 час, соответственно, тогда как конструктор M31-M31-HSA характеризовался временем полужизни 12 часов. Для сравнения,
 40 tandemный конструктор M13-M13 сам по себе (не слитый с MSA) проявлял время полужизни, составляющее 30 минут (не показано).

[0468] В отличие от наблюдений в отношении каркасных структур мышей, при слиянии HSA с каркасными структурами, специфичными по отношению к CD40L человека, значительного понижения действенности не было. На Фиг. 9С показано, что при слиянии
 45 бивалентной каркасной структуры Tn3, специфичной по отношению к CD40L человека, содержащей два мономера 309, с HSA не было значительного понижения действенности согласно измерениям в анализе PMBC.

[0469] РК-свойства конструктора мономерный 342, специфичный по отношению к CD40L

человека—HSA сравнивали с таковыми варианта 342-HSA, содержащего две замены (L463N и K524L) для увеличения времени полужизни в сыворотке у макака-крабоеда после однократной внутривенной инъекции. Белковые конструкторы вводили посредством медленной болюсной инъекции при 10 мг/кг самцам макаков-крабоедов весом 2-5 кг.

У каждого животного из периферического сосуда отбирали 1 мл крови в каждый из моментов времени перед дозированием, через 5 минут и через 30 минут после дозирования; через 2, 12, 24 и 48 часов после дозирования и в дни 4, 8, 11, 15, 22, 29, 36, 43 и 57. Концентрацию конструктора слияния Tn3-HSA в сыворотке определяли с помощью анализа при помощи ELISA. Вкратце, планшеты Nunc MaxiSorp покрывали антителом M2 к FLAG (Agilent), блокировали в 4% молоке в PBS+0,1% Tween (PBST) и инкубировали с MegaCD40L человека (Аххора). MegaCD40L иммобилизовали посредством его FLAG-метки. Образцы сыворотки крови и белковые стандарты разбавляли в 4% молоке в PBST и добавляли после промывания планшета в PBST. После инкубирования планшет промывали в PBST, и для выявления конструкторов слияния Tn3-HSA применяли поликлональное антитело кролика к TN3 (Covance) при помощи антитела козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированного с HRP (Jackson ImmunoResearch), при стандартном протоколе ELISA. Концентрации в образцах сыворотки крови определяли на основе градуировочных кривых в модели линейной регрессии, образованных в ходе анализов разведения того же самого конструктора слияния Tn3-HSA. Концентрации отложены на графике на Фиг. 4В. Время полужизни конструктора 342-HSA составляло приблизительно 7 дней, тогда как конструктор, представляющий собой вариант L463N/K524L 342-HSA, демонстрировал увеличенное время полужизни 13-17 дней в ходе начальной линейной фазы (Фиг. 4В). Через 30 дней концентрации конструктора, представляющего собой вариант L463N/K524L 342-HSA, падали быстрее по сравнению с конструктором на основе HSA дикого типа. Данные наблюдения могут указывать на некоторую иммуногенность данного конструктора для обезьян.

Пример 6

Характеристика CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур

6.1 Экспериментальные способы

[0470] 6.1.1 Анализ стимуляции PBMC. Кровь получали от здоровых доноров согласно руководствам по безопасности от MedImmune. PBMC выделяли посредством пробирок CPT (центрифугирование при 1500 g в течение 20 минут), и 1×10^6 PBMC (на условие) стимулировали с помощью рекомбинантного MegaCD40L человека (Аххора) или клеток Jurkat, в которых происходит экспрессия CD40L человека (D1.1, ATCC). Процентную долю клеток CD19+/CD86+ измеряли с помощью FACS через 24 часа после стимуляции. Данный анализ применяли для тестирования и ранжирования панели лидерных Tn3-каркасных структур, переходя к этому от установления приоритетов на основе биохимических критериев. Анализ также можно осуществлять с использованием клеточной линии, в которой происходит экспрессия CD40L мыши (D10.G4), или с MegaCD40L мыши (Аххора ALX522120) вместо стимуляции клетками человека или рекомбинантным белком, поскольку лиганд мыши дает перекрестную реакцию с рецептором человека.

[0471] 6.1.2 Анализ CD40R/NFkB мыши. Клетки NIH3T3 с репортерами, контролируемые NFkB (репортерная система под контролем NFkB от Panomics и система трансфекции с помощью mCD40R собственного производства) стимулировали с помощью рекомбинантного белка MegaCD40L мыши (Аххора, № по каталогу ALX522120) или клеток D10.G4 (ATCC), в которых происходит сверхэкспрессия CD40L, в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие Tn3-каркасных структур. Bright-Glow

(Promega E2610) добавляли согласно инструкциям производителя. Регистрируемым показателем была люминесценция (700), возникающая посредством активации репортеров, контролируемых NFkB, осуществляемой в системе EnVision (Perkin Elmer).

[0472] 6.1.3 Анализ CD40R/NFkB человека. Клетки НЕК293 с репортерами (от Panomics и собственного производства) стимулировали с помощью рекомбинантного белка MegaCD40L (Аххора ALX522110) или клеток Jurkat субклона D1.1 (ATCC), в которых происходит сверхэкспрессия CD40L, в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие Tn3-каркасных структур. Bright-Glow (Promega E2610) добавляли согласно инструкциям производителя. Регистрируемым показателем была люминесценция (700), возникающая посредством активации репортеров, контролируемых NFkB, осуществляемой в системе EnVision (Perkin Elmer).

[0473] 6.1.4 Анализ двух типов клеток. Первичные Т/В-клетки выделяли из различных доноров. Т-клетки человека CD4⁺ (1x10⁵), стимулированные антителом к CD3 и обработанные митомицином С, культивировали с очищенными В-клетками (5x10⁴). Регистрируемые показатели были следующими. День 2: маркеры активации (FACS), день 5: пролиферация В-клеток (метаболит ATP, Cell-Titer Glo, Invitrogen), день 7: дифференцировка плазматических клеток (FACS), день 7: выработка Ig (ELISA, R&D Systems).

[0474] 6.1.5 Анализы агрегации тромбоцитов. Аденозиндифосфат (ADP) был получен от Chrono-Log (Хэвертаун, Пенсильвания, США). Все остальные продукты были по меньшей мере чистыми для анализа. Образцы крови собирали от здоровых добровольцев, помещали в 12,9 мМ цитрат натрия и центрифугировали при 150 x g в течение 15 минут с получением PRP (плазмы, обогащенной тромбоцитами). После разделения PRP пробирки вновь центрифугировали при 1200 x g в течение 15 минут с получением PPP (плазмы, обедненной тромбоцитами). Тромбоциты промывали с помощью способа, описанного в Mustard *et al.* (Br. J. Haematol. 22:193-204, 1972), и ресуспендировали в растворе Тироде, содержащем 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1% декстрозу, 0,35% бычий сывороточный альбумин, 0,05 ед./мл апиразу, pH 7,35. Агрегацию тромбоцитов изучали с помощью светового трансмиссионного агрегометра (Chrono-Log 700-4DR, Chrono-Log Corporation, Хэвертаун, Пенсильвания, США) и регистрировали в течение 10 мин. после стимуляции тромбоцитов указанными агонистами тромбоцитов согласно описанному. Tn3-каркасные структуры предварительно инкубировали с растворимым CD40L (sCD40L) с образованием иммунных комплексов перед добавлением.

[0475] 6.1.6 Анализы иммунизации. Эритроциты овцы (SRBC) приобретали у Colorado Serum (Денвер, Колорадо) и разводили в 10 раз в среде HBSS непосредственно перед применением. Мышей иммунизировали с помощью 0,2 мл разведенных SRBC в день 0. Первичный ответ зародышевого центра (GC) у мышей, подвергнутых антигенной стимуляции, оценивали через 14 дней после иммунизации посредством FACS (В-клетки из GC, В-клетки не из GC и все субпопуляции Т-клеток). Tn3-каркасные структуры и контрольные образцы вводили в дни 9-13 с повышением дозы каждые 24 часа согласно указанному.

[0476] 6.1.7 Анализы зависимого от Т-клеток образования KLN-специфичных антител (TDAR). Макакам-крабоедам (*Macaca fascicularis*) китайского происхождения весом 3,1 - 4,6 кг (Covance Research Products, Элис, Техас) вводили внутривенно (в подкожную или головную вену) один раз в неделю указанную дозу (0,5, 5, 40 мг/кг) ингибитора (342-мономер-Tn3-HSA и 342-342-бивалент-Tn3-HSA) или контрольного раствора/среды.

KLH (№ партии MD158678A, Supplier Pierce Biotechnologies, Рокфорд, Иллинойс) разбавляли с помощью соответствующего количества стерильной воды для инъекций (Supplier Midwest Veterinary Supply, Норристаун, Пенсильвания) в стерильных условиях. Флаконы взбалтывали с перемешиванием, и их содержимое объединяли в стерильном флаконе. 1 мл раствора KLH (10 мг/мл) вводили подкожно в спину каждого животного слева от срединной линии дважды (в день 1 и в день 29) в течение 1 часа после окончания введения тестируемого или контрольного препарата. Образцы крови для дополнительного анализа получали от всех животных в следующие моменты времени: до тестирования, в дни 4, 6, 8, 11, 15, 22, 25, 32, 34, 36, 39, 43, 46, 50 и 57. Забор образцов, которые собирали в дни 8, 15 и 22, производили перед введением дозы. Оценивание титров KLH-специфичных антител IgM и IgG производили в дни 8, 11 и 15. Титры KLH-специфичных антител IgM и IgG в день 15 показаны на фигурах 5G и 5H, соответственно. Способ титрования с точкой отсечения использовали в формате ELISA для выявления антител к KLH в сыворотке крови обезьян. Образцы инкубировали с KLH, иммобилизованным на планшете для ELISA. После инкубирования планшеты промывали и связанные антитела выявляли с помощью антител IgG-HRP или IgM-HRP козы к иммуноглобулинам обезьяны, а затем визуализировали с помощью тетраметилбензидина (TMB).

[0477] Во всех экспериментах с использованием животных соблюдали принятые в настоящее время практические принципы надлежащего содержания животных, например, изложенные в Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Academy Press, 2011. Huntingdon Life Sciences, Ист-Миллстон, Нью-Джерси, полностью аккредитованные Международной ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC). За животными наблюдал технический персонал в отношении любых состояний, требующих возможного ветеринарного ухода, и при необходимости их лечили.

6.2 CD40L-специфичные Tn3-каркасные структуры осуществляют функциональную нейтрализацию CD40L. Взаимодействия с CD40.

[0478] Т-клетки, в которых происходит экспрессия CD40L, вступают в контакт с В-клетками, в которых происходит экспрессия CD40, что в результате приводит к активации сигнального пути NFκB (Zangani, 2009). Таким образом, клеточную линию с репортерным конструктом NFκB-люцифераза применяли для определения того, могли ли молекулы Tn3, связывающиеся с CD40L, ингибировать передачу сигналов в нисходящем направлении после вступления в контакт с CD40. Клетки HEK293, в которых происходит экспрессия CD40L человека и репортера, стимулировали MegaCD40L человека или мыши при EC₉₀ (эффективная концентрация, приводящая в результате к 90% ингибированию, т.е. 1,5 мкг/мл для MegaCD40L человека и 3 мкг/мл для MegaCD40L мыши).

[0479] Молекула 342, специфичная по отношению к лигандам человека, ингибировала активность NFκB, индуцируемую CD40L человека, при IC₅₀ = 1,5 нМ (Фиг. 13). Молекула M31, специфичная по отношению к лигандам мыши, нейтрализовала активность NFκB, индуцируемую CD40L мыши, при IC₅₀ = 1,6 нМ (Фиг. 1B). Моноклональные антитела как 5c8 (антитела к CD40L человека), так и MR1 (антитела к CD40L мыши), представляющие собой антитела к CD40L из группы положительного контроля, функционировали приблизительно в 10 раз лучше, чем мономерные каркасные структуры Tn3 с IC₅₀ 0,200 нМ +/- SD (самый низкий порог в анализе). Это может быть отчасти связано с бивалентной природой моноклональных антител, которая вносит

вклад в avidность взаимодействия с их соответствующими CD40L.

6.3 Димерные CD40L-специфичные Tn3-каркасные структуры проявляют улучшенное связывание.

[0480] Экспериментальные данные указывают на то, что связывание CD40L-специфичной бивалентной Tn3-каркасной структуры было улучшено по сравнению с таковым CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структуры. Связывание CD40L-специфичной бивалентной Tn3-каркасной структуры с CD40L улучшало воздействие на мишень в некоторых случаях приблизительно на 3 порядка по сравнению с таковым для CD40L-специфичной мономерной Tn3-каркасной структуры *in vitro*, как показано на Фиг. 2С и Фиг. 2D (для лигандов мыши) и на Фиг. 8А и Фиг. 8В (для лигандов человека).

[0481] На Фиг. 2С показано конкурентное ингибирование связывания CD40L мыши с рецептором CD40 мыши, иммобилизованным на биосенсорном чипе с помощью моновалентных (M13) или бивалентных tandemных каркасных структур, специфичных по отношению к CD40L мыши. Мономеры M13 связывались с пептидными линкерами различной длины, содержащими один (1GS), три (3GS), пять (5GS) или семь (7GS) повторов "GGGGS". IC₅₀ каркасной структуры M13-1GS-M13 составляла 29 нМ, тогда как IC₅₀ мономерной каркасной структуры M13 составляла 71 нМ. IC₅₀ бивалентных каркасных структур M13 с более длинными линкерами была значительно более низкой (5-6 нМ).

[0482] На Фиг. 2D показан ингибирующий эффект моновалентных (M13) или бивалентных tandemных каркасных структур, специфичных по отношению к CD40L мыши, в отношении экспрессии CD86, индуцируемой CD40L мыши, в В-клетках. Бивалентные каркасные структуры были приблизительно на 3 порядка более действенными, чем моновалентные каркасные структуры.

[0483] На Фиг. 8А и 8В показано, что Tn3-каркасные структуры 309 и 311, специфичные по отношению к CD40L человека, проявляли увеличенную действенность в формате бивалентного тандема. Бивалентные каркасные структуры 311 (Фиг. 8А) и бивалентные каркасные структуры 309 (Фиг. 8В) демонстрировали приблизительно 7-кратное и 500-1000-кратное улучшение, соответственно, при ингибировании экспрессии, индуцируемой CD40L человека, на CD19-положительных PBMC человека, стимулированных с помощью клеток Jurkat D1.1. Бивалентные каркасные структуры 309 были сравнимы по действенности с моноклональным антителом 5с8 к CD40L человека от Biogen.

[0484] Растворимость, стабильность и легкость очистки не нарушались при добавлении пептидных линкеров различной длины, содержащих один (1GS), три (3GS), пять (5GS) или семь (7GS) повторов "GGGGS" (см. Фиг. 2В).

6.4 Связывание и функционирование CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур.

[0485] В дополнение к биохимическому связыванию, описанному выше, было важно удостовериться в том, что эти новые Tn3-каркасные структуры были способны связываться с эндогенными CD40L, экспрессируемыми на первичных Т-клетках после активации. Т-клетки выделяли из нескольких доноров и активировали согласно описанному. Через 24 часа экспрессия CD40L повышалась, что определяли путем окрашивания моноклональным антителом 5с8 (специфичным по отношению к лигандам человека) и моноклональным антителом MR1 (специфичным по отношению к лигандам мыши) (данные не показаны). С помощью молекул CD40L-специфичных Tn3-каркасных структур, так же как и моноклональных антител, можно было выявлять сопоставимые уровни экспрессии CD40L, что подтверждает, что эти молекулы способны связываться с нативным белком.

[0486] Одним из функциональных последствий взаимодействия CD40L:CD40 является повышение экспрессии костимулирующих молекул на В-клетках (Yellin *et al.*, J. Exp. Med. 6:1857-1864, 1995). Молекулы Tn3, направленные на CD40L, тестировали в отношении их способности предупреждать это явление. Клеточные линии, в которых происходит эндогенная экспрессия CD40L человека или мыши (субклон Jurkat D1.1 или D10.G4, соответственно), применяли для стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). После стимуляции активацию В-клеток оценивали путем измерения процентной доли В-клеток CD19+, в которых происходит повышенная экспрессия CD86, посредством проточной цитометрии. В этом анализе моноклональные антитела из группы положительного контроля были способны уменьшать процентную долю клеток CD19+ с экспрессией CD86 при IC₅₀, составляющей 0,170 нМ (5с8) и 0,230 нМ (MR1). Оптимизированный Tn3 342, специфичный по отношению к лигандам человека, был способен оказывать антагонистическое влияние на повышение экспрессии CD86 при значениях IC₅₀ = 0,700 нМ (n = 5 доноров) (см. Фиг. 10В и Таблицу 7).

[0487] Оптимизированный Tn3 M31, специфичный по отношению к лигандам мыши, характеризовался IC₅₀ 1,5 нМ. Эти подобные результаты наблюдали в случае, когда для стимуляции PBMC применяли рекомбинантный белок Mega-CD40L. Экспериментальные данные демонстрировали, что обе молекулы, специфичные либо по отношению к лигандам мыши, либо по отношению к лигандам человека, могут ингибировать не только главный сигнальный путь в клетке (NFKB), но также одну из его наиболее важных функциональных ролей: взаимодействия Т- и В-клеток. Это ингибирующее действие может препятствовать внесению вклада CD40L во многие аутоиммунные заболевания и состояния.

6.5 Tn3, связывающиеся с CD40L, ингибируют пролиферацию В-клеток и дифференцировку плазматических клеток после совместного культивирования Т/В-клеток.

[0488] Взаимодействия CD40L на Т-клетках с В-клетками, в которых происходит экспрессия CD40, представляют собой фундаментальный аспект хелперного действия Т-клеток, которое способствует развитию форм адаптивного иммунного ответа (Banchereau, 1994; Oхenius, 1996, van Kooten & Banchereau, 1997). Для моделирования этого явления связывающиеся с hCD40L конструкторы слияния Tn3-HSA, содержащие 340, 342 и димер 342-342, оценивали в совместных культурах первичных клеток, содержащих Т-клетки и В-клетки, где стимулированные с помощью антитела к CD3, обработанные митомицином С Т-клетки CD4+ человека культивировали с очищенными В-клетками человека. Измеряли способность В-клеток к пролиферации на четвертый день, к дифференцировке в плазматические клетки (PC) к седьмому дню и к переключению классов вырабатываемых ими антител (данные относительно PC и антител не показаны) (Фиг. 15) (Ettinger, 2007). CD40L-специфичная Tn3-каркасная структура 342-342-HSA была способна снижать темпы пролиферации, индуцируемой Т-клетками, по меньшей мере на 50% по сравнению с клеточной пролиферацией В-клеток в отсутствие каркасных структур или в присутствии неспецифичной контрольной каркасной структуры. Пролиферация является предшественником и первым сигналом дифференцировки плазматических клеток после лигандирования CD40L:CD40. Также наблюдали ингибирование дифференцировки плазматических клеток и переключения классов антител (данные не показаны).

6.6 *In vivo* разрушение оси CD40:CD40L.

[0489] Центральная роль взаимодействий CD40L:CD40R в формах Т-зависимого

иммунного ответа была хорошо охарактеризована (Noelle, 1992; Renshaw, 1994, Wykes, 2003). Тn3-каркасную структуру M31, специфичную по отношению к CD40L мыши (M31-MSA и M31-M31-MSA), применяли для оценивания эффектов этих новых молекул в модели Т-зависимой иммунизации путем иммунизации мышей (внутривенно) в нулевой день эритроцитами овцы (SRBC).

[0490] В дни 9-13 мышам внутрибрюшинно ежедневно инъецировали указанную дозу ингибитора, и в день 14 подсчитывали количество В-клеток из GC в селезенке и в лимфатических узлах. Ежедневное дозирование было необходимо с учетом короткого $T_{1/2}$ данной молекулы *in vivo*, составляющего 31 час (Фиг. 4). На основании предыдущих данных результатов исследований точно установлено, что CD40L регулирует такие формы гуморального ответа, как образование зародышевых центров в анатомических участках, таких как селезенка и лимфатические узлы (Jacob, 1991). В данном случае наблюдали дозозависимое разрушение оси CD40L:CD40, которая вносит вклад в такое образование, при помощи M31-MSA, в отличие от "наивной" молекулы или неспецифичного контроля, D1-MSA, как видно из процентной доли В-клеток из GC.

[0491] Даже при 10 мг/кг M31-MSA был способен свести к нулю процент В-клеток из GC (Фиг. 5B), также как и моноклональное антитело MR1 (Фиг. 5A). Другие субпопуляции клеток выглядели нормальными, в том числе специфические популяции Т-клеток, что позволяет убедиться в том, что наблюдаемые результаты не были связаны с элиминацией Т-клеток (Фиг. 5C, Фиг. 5D, Фиг. 5E). В дополнение, результаты по данным ELISA с Ig, представляющим собой антитела к SRBC, отражали таковые по данным относительно В-клеток из зародышевых центров (Фиг. 5F). Взятые вместе, эти данные указывают на то, что Тn3-каркасная структура M31-MSA, специфичная по отношению к лигандам мыши, может прекращать реакции, управляемые посредством сигнального пути CD40.

[0492] Подобным образом, Тn3-каркасную структуру 342, специфичную по отношению к CD40L лигандам человека (342-HSA и 342-342-HSA), применяли для оценивания эффектов этих новых молекул в модели зависимого от Т-клеток образования KLN-специфичных антител (TDAR) на макаках-крабоедах. В данном случае разрушение оси CD40L:CD40 приводит в результате к дозозависимому подавлению образования антител к антигену KLN. Как показано на фигурах 5G и 5H, бивалентный конструктор 342 подавлял уровни антител IgM и IgG при 0,5 мг/кг (миллиграммов на килограмм), а при 5 мг/кг наблюдалось почти полное подавление. Мономерный конструктор 342 также подавлял уровни IgM и IgG, но при более высоких концентрациях, при этом при 40 мг/кг наблюдалось почти полное подавление. Эти данные указывают на то, что оба специфичных для лигандов человека конструктора, представляющие собой каркасные структуры Тn3 342-HSA и 342-342-HSA, могут прекращать реакции, управляемые посредством сигнального пути CD40.

6.7 Тn3-каркасные структуры, специфичные по отношению к CD40L человека, не индуцируют агрегацию тромбоцитов.

[0493] Клинические испытания с участием людей с использованием моноклональных антител к CD40L приостанавливали, когда у некоторых пациентов возникали случаи тромбозмболии (Davidson *et al. Arth Rheu*, 43:S271). Последующие доклинические анализы позволили предположить, что это явление представляет собой свойственный классу эффект моноклональных антител к CD40L в отношении мишеней. Таким образом, было важно провести тестирование Тn3-каркасных структур, специфичных по отношению к CD40L человека, в анализах агрегации тромбоцитов.

[0494] В случае применения соотношения трех молекул физиологического CD40L к

одной молекуле моноклонального антитела к CD40L в цитратной плазме, обогащенной тромбоцитами (PRP), промытых тромбоцитах и цельной крови наблюдали проагрегантные эффекты (Фиг. 16А). Эти эффекты были опосредованы взаимодействиями, зависимыми от Fc-домена моноклонального антитела, после связывания с CD40L (данные не показаны). В отсутствие слияния с Fc-доменом агрегацию не наблюдали. У нескольких доноров при любых специфичных по отношению к CD40L человека Tn3-каркасных структурах в качестве димеров или в качестве белков слияния на основе HSA не наблюдали агрегацию (Фиг. 16В и Фиг. 16С).

[0495] Пагубные побочные эффекты, наблюдаемые в клинических испытаниях, наблюдали при образовании растворимого иммунного комплекса CD40L/моноклональное антитело к CD40L в присутствии тромбоцитов (Фиг. 16А и кривая 5С8 на Фиг. 16С). Другой пример этого явления можно наблюдать в гистологическом исследовании трансгенного FcγRIIIa человека на мышах (Francis *et al.*, 2010). После введения растворимых иммунных комплексов CD40L/моноклональное антитело в легочной ткани в течение нескольких минут после введения наблюдали большое количество тромбов. Однако, при повторении с использованием Tn3-каркасных структур, связывающихся с CD40L, легкое характеризовалось нормальным гистологическим строением, что находилось в соответствии с контрольными образцами (данные не показаны).

Пример 7

Домены фибронектина типа III, сконструированные для связывания с CD40L: клонирование, экспрессия, очистка, кристаллизация и предварительный рентгеновский дифракционный анализ двух комплексов.

[0496] Рекомбинантный растворимый CD40L человека подвергали совместной кристаллизации с CD40L-специфичными мономерными Tn3-каркасными структурами, 309 и 311K4E-12, обе из которых были выделены в качестве молекул, связывающихся с CD40L, из фаг-дисплейных библиотек. Дифракция на кристаллах происходила при разрешении до 3,1 и 2,9 Å, соответственно. В дополнение, рекомбинантный растворимый CD40L человека подвергали совместной кристаллизации с оптимизированным мономерным Tn3 342 в отдельности и вместе, как с мономерным 342, так и с мономерным 311K4E_12. Дифракция на кристаллах, соответствующих этим структурам, происходила при разрешении до 2,8 и 1,9 Å, соответственно. Соответствующие кристаллические структуры помогают понять взаимодействие между каркасными структурами Tn3 и CD40L и могут применяться для разработки молекул, связывающихся с CD40L с более высокой аффинностью, и tandemных конструкторов, связывающихся с несколькими эпитопами.

7.1 Экспрессия и очистка молекул Tn3 и растворимого CD40L человека

[0497] Для получения молекул Tn3 без меток для кристаллизации белки экспрессировали в *E. coli* при помощи IPTG-индуцируемого вектора собственного производства, предназначенного для секреции белков, экспрессируемых рекомбинантным путем, в периплазматическое пространство. Этот вектор имел промотор P_{tac}, мутантную форму L25/М сигнального пептида OppA (MTNITKRSIVAAGVLAALMAGNVAMA) (SEQ ID NO: 210), C-концевую 8xHis-метку в дополнение к сайту расщепления тромбина. Последовательности Tn3 субклонировали между сигнальным пептидом и сайтом расщепления тромбина.

[0498] Экспрессируемые секретируемые белки с His-метками очищали при помощи смолы Ni-NTA согласно инструкциям производителя (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США) и затем расщепляли с помощью тромбина с последующей повторной аффинной

очисткой при помощи Ni-NTA для удаления неразрезанного интактного белка и отрезанного фрагмента с His-меткой. За этим этапом очистки следовал этап ионного обмена при помощи колонок HiTrap Q (GE Healthcare, Пискатавэй, Нью-Джерси, США), который выполняли на Äkta Purifier (GE Healthcare, Пискатавэй, Нью-Джерси, США).
 5 Очищенные белки Tn3 без меток демонстрируют более чем 95% чистоту и однородность на основе результатов SDS-PAGE и SEC.

[0499] Ген растворимого CD40L человека (113-261, UNIPROT: P29965) синтезировали с помощью GeneArt с N-концевой 6xHis-меткой и клонировали в вектор экспрессии у млекопитающих собственного производства под контролем основного немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (hCMVie) (Boshart *et al.*, Cell 41: 521-530, 1985).
 10 Ген CD40L клонировали внутри рамки считывания с сигнальным пептидом CD33. Гены EBNA и Ori P в векторе применяли для повышения уровня экспрессии белка. Ген CD40L также включал последовательность поли-A SV40, обеспечивающую возможность должного процессинга 3'-конца его мРНК. Конструкт подвергали транзientной
 15 трансфекции в клетки из суспензионной культуры 293F (эмбриональные клетки почек человека [HEK], выращиваемые в среде 293 Freestyle с применением 293 Fectin, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Клетки выращивали с применением стандартного протокола, и со среды осуществляли сбор через 4 и 8 дней. Растворимый белок CD40L затем очищали при помощи смолы Ni-NTA с последующим этапом ионного обмена с
 20 помощью колонки Hi-Trap SP FF (GE Healthcare, Пискатавэй, Нью-Джерси, США) и диализом против 50 mM Tris с pH 7,5, 50 mM NaCl.

[0500] Для получения комплексов молекулу Tn3, 309, или 311K4E_12, или 342, смешивали с CD40L в соотношении 1,1:1, концентрировали при помощи концентраторов Vivaspin (предельное значение 30000 Да; GE Healthcare, Пискатавэй, Нью-Джерси, США)
 25 до приблизительно 10 мг/мл и подвергали эксклюзионной хроматографии (SEC) при помощи колонки Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Пискатавэй, Нью-Джерси, США), предварительно уравновешенной с помощью 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,02% NaN₃ (Фиг. 19, панель А). После этапа разделения комплекс концентрировали
 30 до 18 мг/мл и подвергали кристаллизации. Комплекс 342-311K4E_12-CD40L получали в точности так, как описано выше, с применением трех компонентов в соотношении 1,1:1,1:1.

7.2 Скрининг и оптимизация условий кристаллизации

[0501] Организацию экспериментов по кристаллизации в "сидячей капле" осуществляли в 96-луночных планшетах Intelli (Art Robbins Instruments, Саннивэйл, Калифорния, США)
 35 при помощи робота для создания кристаллизационных растворов Phoenix (Art Robbins Instruments, Саннивэйл, Калифорния, США) путем смешивания луночного раствора и раствора белкового комплекса, имеющих объемы 300 нл, в ячейке для капель и предоставления им возможности уравновешивания против 50 мкл луночного раствора. Применяли коммерческие наборы для скрининга условий кристаллизации от Hampton
 40 Research (Алисо-Вьехо, Калифорния, США), Emerald BioSystems (Бэйнбридж-Айленд, Вашингтон, США) и Molecular Dimensions (Апопка, Флорида, США).

[0502] Для кристаллизации каждого из комплексов 309-CD40L, 342-CD40L и 342-311K4E_12-CD40L требовался этап оптимизации, который включал дополнительный этап скрининга с помощью Additive Screen HT (Hampton Research, Алисо-Вьехо,
 45 Калифорния, США). На этапе оптимизации луночный раствор, которым заполняли 96-луночный планшет, состоял на 80% из раствора, дающего нужный эффект на начальном этапе скрининга, и на 20% из соответствующей добавки. Каплю создавали из 300 нл белкового раствора и 300 нл нового луночного раствора после тщательного

перемешивания последнего. Кристаллы, обладающие должным качеством для дифракции, собирали непосредственно из 96-луночного планшета. В целях криоконсервации кристалл последовательно переносили в три раствора маточной жидкости с повышающейся концентрацией глицерина.

- 5 [0503] Кристаллы 311-CD40L, обладающие должным качеством для дифракции, выращивали в растворе из начального этапа скрининга, который не требует добавления криопротектора.

7.3 Рентгеновская дифракция и сбор данных

- 10 [0504] Картины рентгеновской дифракции для комплекса 309-CD40L получали от монокристалла на Beamline 5.0.3 в Усовершенствованном источнике света, Национальная лаборатория имени Лоуренса в Беркли (Калифорнийский университет, Беркли), оборудованном рентгеновским детектором ADSC Q315R CCD (Area Detector Systems Corporation, Повей, Калифорния, США). Собирали 360 последовательных изображений с диапазоном колебаний $0,5^\circ$ при расстоянии между кристаллом и детектором 300 мм
15 и времени облучения 0,8 секунд.

- [0505] Картины рентгеновской дифракции для комплексов 311K4E_12-CD40L, 342-CD40L и 342-311K4E_12-CD40L получали от монокристаллов на Beamline 31-ID-D в Усовершенствованном источнике фотонов, Аргоннская национальная лаборатория (Чикагский университет, Чикаго, Иллинойс), оборудованном детектором Rayonix 225
20 HE (Rayonix LLC, Эванстон, Иллинойс, США). Собирали 180 последовательных изображений с диапазоном колебаний 1° при расстоянии между кристаллом и детектором 300 мм и времени облучения 0,8 секунд.

- [0506] Уменьшение и увеличение размера всех наборов данных осуществляли при помощи пакета программ HKL2000 (Otwinowski & Minor, Methods in Enzymology, 276:
25 307-326. 1997).

7.4 Результаты и обсуждение

- [0507] Наиболее воспроизводимым условием кристаллизации комплекса 309-CD40L, по-видимому, являлось B5 (0,2 М NaNO_3 , 20% PEG 3350) в случае набора для скрининга Peg/Ion (Hampton Research). При дополнительной оптимизации с помощью Additive Screen
30 получали кристалл, обладающий должным качеством для дифракции, получаемый при условии A1 (0,1 М $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Кристалл, показанный на Фиг. 19, панель В, собирали с 96-луночного планшета и охлаждали в жидком азоте после переноса в раствор маточной жидкости, дополненный 20% глицерином.

- 35 [0508] Симметрия пространственной группы. Кристалл принадлежал к орторомбической пространственной группе P212121 с параметрами ячейки $a=85,69 \text{ \AA}$, $b=90,64 \text{ \AA}$, $c=95,56 \text{ \AA}$, и дифракция на нем происходила при разрешении до $3,1 \text{ \AA}$. Ожидается, что асимметричная единица содержит тример CD40L и три молекулы 309 со значением VM приблизительно $2,3 \text{ \AA}^3/\text{Да}$.

- 40 [0509] Что касается кристаллизации 311K4E_12-CD40L, в случае набора для скрининга Cryo I & II (Emerald BioStructures) получали ряд условий, которые не требовали ни оптимизации, ни криоконсервации. Монокристалл (Фиг. 19, панель С), получаемый при условии F7 (40% PEG 600, 0,1 М CH_3COONa , 0,2 М MgCl_2) применяли для сбора данных.

- 45 [0510] Симметрия пространственной группы. Кристалл принадлежал к кубической пространственной группе P213 с параметром ячейки $97,62 \text{ \AA}$, и дифракция на нем происходила при разрешении до $2,6 \text{ \AA}$. Асимметричная единица содержит одну молекулу CD40L и одну молекулу 311K4E_12 со значением VM приблизительно $2,9 \text{ \AA}^3/\text{Да}$.

- [0511] Симметрия пространственной группы 342-CD40L. Кристалл принадлежал к

пространственной группе P321 с параметрами ячейки $a=93,53 \text{ \AA}$, $b=93,53 \text{ \AA}$, $c=66,69 \text{ \AA}$, разрешением $2,8 \text{ \AA}$. Асимметричная единица содержит один мономер CD40L и один мономер 342.

[0512] Симметрия пространственной группы 342-311K4E_12-CD40L. Кристалл принадлежал к пространственной группе P21 с параметрами ячейки $a=80,32 \text{ \AA}$, $b=143,48 \text{ \AA}$, $c=111,27 \text{ \AA}$, $\beta=98,22^\circ$, разрешением $1,9 \text{ \AA}$. Асимметричная единица содержит два тримера CD40, шесть мономеров 342 и шесть мономеров 311K4E-12.

[0513] Статистические данные для всех структур показаны в таблице 10.

Таблица 10. Собранные статистические данные рентгеновской дифракции

	309-CD40L	311K4E-12
Длина волны, \AA	0,9793	0,9793
Разрешение, \AA	50,0-3,05 (3,16-3,05) ^a	50,0-2,94
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 3
Параметры ячейки, \AA	$a=85,69$, $b=90,64$, $c=95,56$	$a=97,62$
Общее число отражений	94024	128140
Число уникальных отражений	14555	6720
Средняя избыточность	6,5 (6,4) ^a	19,2 (19,7)
Завершенность, %	100,0 (100,0) ^a	99,4 (100,0)
R _{sym}	0,097 (0,443) ^a	0,114 (0,785)
Среднее значение I/σ (I)	17,2 (4,6) ^a	20,1 (2,4)

^a Значения в круглых скобках соответствуют объему значений наивысшего разрешения

	342-CD40L	342-311K4E_12-CD40L
Длина волны, \AA	0,9793	0,9793
Разрешение, \AA	50,0-2,8 (2,83-2,82) ^a	144,5-1,9 (1,96-1,95) ^a
Пространственная группа	P321	P2 ₁
Параметры ячейки, \AA	$a=93,53$, $b=93,53$, $c=66,69$	$a=80,32$, $b=143,48$, $c=111,27$, $\beta=98,22^\circ$
Общее число отражений	66038 (549) ^a	733814 (1806) ^a
Число уникальных отражений	8406 (88) ^a	179232 (1806) ^a
Средняя избыточность	7,9 (6,2) ^a	4,1 (4,2) ^a
Завершенность, %	99,9 (100,0) ^a	99,7 (99,6) ^a
R _{sym}	0,19 (0,79) ^a	0,06 (0,57) ^a
Среднее значение I/σ (I)	8,1 (1,4) ^a	14,5 (3,0) ^a

^a Значения в круглых скобках соответствуют объему значений наивысшего разрешения

[0514] CD40L образовывал тример (полипептиды A, B и C на Фиг. 17A). Каждая Tn3-каркасная структура 309 (полипептиды D, E и F на Фиг. 17A) образовывала контакт с двумя полипептидами CD40L. В кристаллической структуре выявили, что между каждой каркасной структурой 309 и первым и вторым полипептидами CD40L существовали шесть специфических контактов. Аспарагиновая кислота 17 в ВС образует контакт с треонином 251 в первом CD40L. Глутаминовая кислота 18 в петле ВС образует контакт с аргинином 203 в первом CD40L и с изолейцином 204 во втором CD40L. Серин 47 в петле DE образует контакт с гистидином 249 в первом CD40L. Триптофан 49 в петле DE образует контакт с валином 247 в первом CD40L. Аспарагиновая кислота 70 в петле FG образует контакт с серином 185 во втором CD40L (см. Фиг. 17A). Аминокислотные остатки CD40L, контактирующие с каркасной структурой 311, также показаны на Фиг. 18A.

[0515] Как и в случае 309, каждая мономерная каркасная структура 311K4E_12 (полипептиды А, В и С на Фиг. 17В) образует контакт с двумя полипептидами CD40L. В кристаллической структуре выявили, что между каждой каркасной структурой 311K4E_12 и первым и вторым полипептидами CD40L существовали 19 специфических контактов. Аспарагин 17 в петле ВС образует контакты с тирозином 146 и глутаминовой кислотой 142 в первом CD40L. Аргинин 18 в петле ВС образует контакт с глутаминовой кислотой 142, тирозином 146 и метионином 148 в первом CD40L. Серин 19 в петле ВС образует контакт с глутаминовой кислотой 142 и лейцином 155 в первом CD40L. Серин 22 в петле ВС образует контакт с аспарагином 151 в первом CD40L. Гистидин 15 в петле ВС образует контакт с тирозином 146 в первом CD40L. Гистидин 51 в петле DE образует контакт с тирозином 146 в первом CD40L и с глутаминовой кислотой 230 во втором CD40L. Валин 50 в петле DE образует контакт с глутаминовой кислотой 230 во втором CD40L. N-концевой участок мономерной каркасной структуры 311K4E_12 соединен со вторым CD40L. Аргинин 200 во втором CD40L образует контакт с треонином 7, аспарагиновой кислотой 8 и треонином 10 в N-концевом участке 311K4E_12. Аргинин 203 во втором CD40L образует контакт с глутаминовой кислотой 4 и аспарагиновой кислотой 5. Аминокислотные остатки CD40L, контактирующие с каркасной структурой 309, также показаны на Фиг. 18В.

[0516] Из кристаллических структур CD40L в комплексах с 309 и 311K4E_12 было видно, что мономерные каркасные структуры 311K4E_12 и 309 связываются с различными эпитопами, расположенными в различных частях тримерного комплекса CD40L (Фиг. 17С). Из структур было видно, что обе каркасные структуры связываются в одной и той же бороздке, которая будет взаимодействовать с рецептором CD40.

[0517] Кристаллическая структура 342 с CD40L представлена на фигуре 20, и из нее видно, что хотя 342 связывается с той же частью CD40L, наблюдаются специфические изменения в остатках, образующих контакты, по сравнению с исходным клоном 309. Конкретно, в 342 аспартат 18 в петле ВС формирует контакт с треонином 251 CD40L, а гистидин 47 петли DE образует контакт с гистицином 249 CD40L, гистидин 48 петли DE образует контакт с гистицином 249, серином 245 и серином 248 CD40L, а гистидин 50 петли DE образует контакт с валином 247 CD40L.

[0518] Кристаллическая структура 342 и 311K4E_12 с CD40L демонстрирует, что обе каркасные структуры могут одновременно связываться с их соответствующими эпитопами, расположенными в различных частях тримерного комплекса CD40L (Фиг. 21). Контакты с каждой отдельной каркасной структурой (как описано выше) сохраняются.

[0519] Примеры, показанные выше, иллюстрируют различные аспекты настоящего изобретения и практическое осуществление способов по настоящему изобретению. Эти примеры не предназначены для обеспечения полного описания многих различных вариантов осуществления настоящего изобретения. Таким образом, хотя настоящее изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примеров в целях ясности понимания, средние специалисты в данной области без труда осознают, что могут быть внесены многие изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

[0520] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1

CD40L sp|P29965|CD40L_ЧЕЛОВЕКА – мембранная форма

Цитоплазматический домен = 1-20

участок сигнального якорного мембранного белка типа II = 21-46

растворимая форма = 113-261

MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERN

LH

EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGD
QNP

QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVT
FCSN

REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF
VN

VTDPSQVSHGTGFTSFGLLLKL

SEQ ID NO: 2

CD40L– растворимая форма, также соответствующая конструкту, полученному в
результате совместной кристаллизации

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQG
LYYIY

AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFE
LQ

PGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLLKL

SEQ ID NO: 3

Tn3 (с немодифицированными петлями)

IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTYGKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKP
TE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 4

3-ий FnIII из тенасцина C, петля AB (Tn3)

KDVTDTT

SEQ ID NO: 5

3-ий FnIII из тенасцина C, петля BC (Tn3)

FKPLAEIDG

SEQ ID NO: 6

3-ий FnIII из тенасцина C, петля CD (Tn3)

KDVPGDR

SEQ ID NO: 7

3-ий FnIII из тенасцина C, петля DE (Tn3)

TEDENQ

SEQ ID NO: 8

3-ий FnIII из тенасцина C, петля EF (Tn3)

GNLKPDE

SEQ ID NO: 9

3-й FnIII тенасцина C, FG-петля (Tn3); также в клонах 309FGwt, 340,341, 342, 343, 344,

345, 346, 347, 348 и 349

RRGDMSSNPA

SEQ ID NO: 10

3-ий FnIII из тенасцина C, бета-цепь A (Tn3)

RLDAPSQIEV

SEQ ID NO: 11

3-й FnIII тенащина С, N-концевое усечение бета-цепи А (Tn3)

IEV

5 SEQ ID NO: 12

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь В (Tn3)

ALITW

SEQ ID NO: 13

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь С (вариант Tn3)

10 CELAYGI

SEQ ID NO: 14

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь С (Tn3)

CELYGI

SEQ ID NO: 15

15 3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь D (Tn3)

TTIDL

SEQ ID NO: 16

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь E (Tn3)

YSI

20 SEQ ID NO: 17

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь F (Tn3)

YEVSLIC

SEQ ID NO: 18

3-ий FnIII из тенащина С, бета-цепь G (Tn3)

25 KETFTT

SEQ ID NO: 19

Клон 309 - исходный клон, выделенный из наивной библиотеки Tn3

AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLK

PDT

30 EYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 20

Клон 309 - исходный клон, выделенный из наивной библиотеки Tn3 (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKP

35 DTE

YEVSLICYTDQEAGNPAKETFTT

SEQ ID NO: 21

Клон 309FGwt - исходный клон с "гуманизированной" петлей FG

AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLK

40 PDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 22

Клон 309FGwt - исходный клон с "гуманизированной" петлей FG (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

45 IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKP

DTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 23

Клон 340 - вариант с созревшей аффинностью
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNL
 KPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

5 SEQ ID NO: 24

Клон 340 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLK
 PDTE

10 YEVSICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 25

Клон 341 - вариант с созревшей аффинностью

AIEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNL
 KPDT

15 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 26

Клон 341 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLK

20 PDTE

YEVSICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 27

Клон 342 - вариант с созревшей аффинностью (с петлей FG дикого типа) AIEVKDV
 TDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHNAHYSIGNLKPD

25 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 28

Клон 342 - вариант с созревшей аффинностью (с петлей FG дикого типа; без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHNAHYSIGNLKP

30 DTE

YEVSICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 29

Клон 343 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWLDDWGSYH
 VCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHQA WYSIGNLKPD

35 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 30

Клон 343 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWLDDWGSYHVCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHQA WYSIGNLK

40 PDTE

YEVSICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 31

Клон 344 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDEVGDYV
 CELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPD

45 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 32

Клон 344 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDEVG DYVVCELT YGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLK
PDTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 33

5 Клон 345 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVG
CELT YGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 34

Клон 345 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого
10 линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVGCELT YGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKP
DTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 35

15 Клон 346 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDDFEEYV
CELT YGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 36

Клон 346 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого
20 линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDFEEYVCELT YGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKP
DTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 37

25 Клон 347 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVG
CELT YGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 38

Клон 347 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого
30 линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVGCELT YGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLK
PDTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 39

35 Клон 348 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVW
CELT YGIKDVPGDRTTIDLWFHQAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 40

Клон 348 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого
40 линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVWCELT YGIKDVPGDRTTIDLWFHQAWYSIGNLKP
DTE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 41

45 Клон 349 - вариант с созревшей аффинностью AIEVKDVTDTTALITWSDEHAEFIGC
ELT YGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 42

Клон 349 - вариант с созревшей аффинностью (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWSDEHAFIGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPD
TE

5 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 43

Клон 311 - исходный клон, выделенный из наивной библиотеки Tn3

AIEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK
KP

10 DTEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 44

Клон 311 - исходный клон, выделенный из наивной библиотеки Tn3 (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK

15 PD
TEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 45

Клон 311K4E - вариант из первого цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK

20 KP
DTEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 46

Клон 311K4E - вариант из первого цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

25 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK
PD

TEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 47

Клон 311K4E_1 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

30 AIEVEDVTDTTALITWINRSYYADLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDL DQIYVHYSIGNLK
KP

DTKYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 48

35 Клон 311K4E_1 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWINRSYYADLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDL DQIYVHYSIGNLK

PD
TKYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 49

40 Клон 311K4E_2 – вариант клона из второго цикла созревания аффинности AIEVED
VTDTTALITWTNRSSYSHLDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSAAIYVHYSIGNLK

PDTEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 50

45 Клон 311K4E_2 – вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки) IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSHL
DGCELTGYIKDVPGDRTTIDLSAAIYVHYSIGNLK

PDTEYEVS LICLT TDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 51

Клон 311K4E_3 – вариант клона из второго цикла созревания аффинности
 AIEVEDVTDTTALITWINRSSYHNFPHCELAYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNL
 KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

5 SEQ ID NO: 52

Клон 311K4E_3 – вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого A, и C-концевого линкера, и His8-метки) IEVEDVTDTTALITWINRSSYHNFP
 HCELAYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

10 SEQ ID NO: 53

Клон 311K4E_4 – вариант клона из второго цикла созревания аффинности
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNHLGCELAYGIKDVPDRTTIDLNNIYVHYSIGNL
 KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

15 SEQ ID NO: 54

Клон 311K4E_4 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого A, и C-концевого линкера, и His8-метки) IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNHLGCELAYGIKDVPDRTTIDLNNIYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

20 SEQ ID NO: 55

Клон 311K4E_5 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNFHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNL
 KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

25 SEQ ID NO: 56

Клон 311K4E_5 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого A, и C-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNFHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

30 TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 57

Клон 311K4E_7 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSFYNSLHGCELTGKIDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNL
 KP

35 DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 58

Клон 311K4E_7 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого A, и C-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTNRSFYNSLHGCELTGKIDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP

40 PD TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 59

Клон 311K4E_8 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNL

45 KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 60

Клон 311K4E_8 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-

концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTT

5 SEQ ID NO: 61

Клон 311K4E_9 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGYIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNL
KP

DTEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

10 SEQ ID NO: 62

Клон 311K4E_9 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGYIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK
PD

15 TEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 63

Клон 311K4E_10 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNL
KP

20 DTEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 64

Клон 311K4E_10 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
25 PD

TEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 65

Клон 311K4E_11 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVDTTALITWTNRSSYANLPGCELTGYIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNL
30 KP

DTEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 66

Клон 311K4E_11 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

35 IEVEDVDTTALITWTNRSSYANLPGCELTGYIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSILCLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 67

Клон 311K4E_12 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

40 AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNL
KP

DTEYEVSILCLTTDGTYNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 68

Клон 311K4E_12 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

45 IEVEDVDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSILCLTTDGTYNPAKETFTT

SEQ ID NO: 69

Клон 311K4E_13 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELTGYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNL

KP

5 DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 70

Клон 311K4E_13 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELTGYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNLK

10 PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 71

Клон 311K4E_14 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTARSAYSHHHYCELTGYGIKDVPDRTTIDLRQPYVHYSIGNL

15 KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 72

Клон 311K4E_14 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

20 IEVEDVTDTTALITWTARSAYSHHHYCELTGYGIKDVPDRTTIDLRQPYVHYSIGNLK

PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 73

Клон 311K4E_15 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

25 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHHCELTGYGIKDVPDRTTIDLELYVHYSIGNLK

PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 74

Клон 311K4E_15 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

30 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHHCELTGYGIKDVPDRTTIDLELYVHYSIGNLK

DT

EYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 75

35 Клон 311K4E_16 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSDLPCELTGYGIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNL

KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 76

40 Клон 311K4E_16 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSDLPCELTGYGIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLK

PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

45 SEQ ID NO: 77

Клон 311K4E_19 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTHRSAYSNHSFCELTGYGIKDVPDRTTIDLNTPYVHYSIGNL

KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 78

Клон 311K4E_19 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTHRSAYSNHSFCELTGYIKDVPGDRTTIDLNTPYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 79

Клон 311K4E_20 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTNRSLYANFHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLEQVYVHYSIGNL
KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 80

Клон 311K4E_20 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTNRSLYANFHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLEQVYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 81

Клон 311K4E_21 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTGYIKDVPGDRTTIDLNQVYVHYSIGNL
KP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 82

Клон 311K4E_21 - вариант клона из второго цикла созревания аффинности (без N-концевого А, и С-концевого линкера, и His8-метки)

IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTGYIKDVPGDRTTIDLNQVYVHYSIGNLK
PD

TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 83

Клоны 309 и 309FGwt - петля BC

SDEFGHYDG

SEQ ID NO: 84

Клон 340 - петля BC

SDDFDNYEW

SEQ ID NO: 85

Клон 341 - петля BC

SDDFADYVW

SEQ ID NO: 86

Клон 342 - петля BC

SDDFGEYVW

SEQ ID NO: 87

Клон 343 - петля BC

LDDWGSYHV

SEQ ID NO: 88

Клон 344 - петля BC

SDEVGDYVV

SEQ ID NO: 89

Клон 345 - петля BC
SDDFAEYVG
SEQ ID NO: 90
Клон 346 - петля BC
5 SDDFEEYVV
SEQ ID NO: 91
Клон 347 – петля BC
SDEVGQYVG
SEQ ID NO: 92
10 Клон 348 – петля BC
SDDIGLYVW
SEQ ID NO: 93
Клон 349 - петля BC
SDEHAEFIG
15 SEQ ID NO: 94
Клоны 309, 309FGwt, 341, 345, 346, 349 – петля DE
WWHSAW
SEQ ID NO: 95
Клоны 340, 344, 347 – петля DE
20 WYHMAW
SEQ ID NO: 96
Клон 342 - петля DE
WYHNAH
SEQ ID NO: 97
25 Клон 343 – петля DE
WYHQAW
SEQ ID NO: 98
Клон 348 – петля DE
WFHQAW
30 SEQ ID NO: 99
Клон 309 – петля FG
YTDQEAGNPA
SEQ ID NO: 100
Клоны 311, 311K4E - петля BC
35 TNRSSYYNLHG
SEQ ID NO: 101
Клон 311K4E_1 - петля BC
INRSYYADLHG
SEQ ID NO: 102
40 Клон 311K4E_2 - петля BC
TNRSSYSHLDG
SEQ ID NO: 103
Клон 311K4E_3 - петля BC
INRSYHNFPH
45 SEQ ID NO: 104
Клон 311K4E_4 - петля BC
TNRSSYSNHLG
SEQ ID NO: 105

Клон 311K4E_5 - петля BC
 TNRSSYSNFHG
 SEQ ID NO: 106
 Клон 311K4E_7 - петля BC
 5 TNRSFYSNLHG
 SEQ ID NO: 107
 Клон 311K4E_8 - петля BC
 TNRSSYAYLHG
 SEQ ID NO: 108
 10 Клоны 311K4E_9, 311K4E_13 - петля BC
 INRSSYANLHG
 SEQ ID NO: 109
 Клон 311K4E_10 - петля BC
 TNRSSYANYHG
 15 SEQ ID NO: 110
 Клон 311K4E_11 - петля BC
 TNRSSYANLPG
 SEQ ID NO: 111
 Клон 311K4E_12 - петля BC
 20 TNRSSYSNLHG
 SEQ ID NO: 112
 Клон 311K4E_14 - петля BC
 TARSAYSHHHY
 SEQ ID NO: 113
 25 Клон 311K4E_15 - петля BC
 TNRSSYANYHH
 SEQ ID NO: 114
 Клон 311K4E_16 - петля BC
 TNRSSYSDLPG
 30 SEQ ID NO: 115
 Клон 311K4E_19 - петля BC
 THRSAYSNHSF
 SEQ ID NO: 116
 Клон 311K4E_20 - петля BC
 35 TNRSLYANFHG
 SEQ ID NO: 117
 Клон 311K4E_21 - петля BC
 TNRSSYSNLPG
 SEQ ID NO: 118
 40 Клоны 311, 311K4E, 311K4E_9, 311K4E_16 - петля DE
 SSPYVH
 SEQ ID NO: 119
 Клон 311K4E_1 - петля DE
 DQIYVH
 45 SEQ ID NO: 120
 Клон 311K4E_2 - петля DE
 SAAIYVH
 SEQ ID NO: 121

Клон 311K4E_3, 311K4E_5, 311K4E_11, 311K4E_13 - петля DE

NSPYVH

SEQ ID NO: 122

Клон 311K4E_4 - петля DE

NNIYVH

SEQ ID NO: 123

Клон 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_10, 311K4E_12 - петля DE

NQPYVH

SEQ ID NO: 124

Клон 311K4E_14 - петля DE

RQPYVH

SEQ ID NO: 125

Клон 311K4E_15 - петля DE

ELYVH

SEQ ID NO: 126

Клон 311K4E_19 - петля DE

NTPYVH

SEQ ID NO: 127

Клон 311K4E_20 - петля DE

EQVYVH

SEQ ID NO: 128

Клон 311K4E_21 - петля DE

NQVYVH

SEQ ID NO: 129

Клоны 311, 311K4E, 311K4E_1, 311K4E_2, 311K4E_3, 311K4E_4, 311K4E_5, 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_9, 311K4E_10, 311K4E_11, 311K4E_13, 311K4E_14, 311K4E_15, 311K4E_16, 311K4E_19, 311K4E_20, 311K4E_21 - петля FG

LTDDGTYSNPA

SEQ ID NO: 130

Клон 311K4E_12 - петля FG

LTDDGTYNPA

SEQ ID NO: 131

Линкер 2GS – (Gly4Ser)²

GGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 132

Линкер 3GS – (Gly4Ser)³

GGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 133

Мутант HSA C34S

Место локализации мутации Cys->Ser подчеркнуто

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI³⁴FAQYL

QQSPFEDHV³⁴KLVNEVTEFAKTCV³⁴ADES³⁴AE

NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP³⁴NLPRLV

RPEV

DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA
CLLP

KLDEL³⁴RDEGKASSAKQRLK³⁴CASLQKFG³⁴ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT
DLTK

VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE
MPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETT
LEKC

5 CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ
VST

PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTES

10 LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAIVELVKHKPK
AT

KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 134

Моновалентный конструктор 342-2GS-HSAC34S

15 HSAC34S подчеркнут
SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNL
KPD

TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLI

20 AFAQYLQQSPFEDHVKLINNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYG

EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARR

HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCA
SLQK

25 FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYIC

ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDV

30 FLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV
EEPQ

NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKR

MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAE

35 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTAIVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKA
DDKE

TCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 135

Бивалентный конструктор 342-3GS-342-2GS-HSAC34S

40 HSA подчеркнут
SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNL
KPD

TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTT
ALI

45 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSG
DMS

SNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFE
DHV

KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNE

CFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFF
AKR

5 YKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWA
VARLS

QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKE
CCE

10 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYAR
RHPD

YSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQ
LGE

YKFQNALIVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQL

15 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE
KE

RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL
VAASQ

AALGL

20 SEQ ID NO: 136

Вариант петли AB с N-концевым E, характерный для клонов из семейства 311

EDVTDTT

SEQ ID NO: 137

Вариант петли EF с C-концевым K, характерный для клонов из семейства 311

25 GNLKPDTK

SEQ ID NO: 138

HSA человека полной длины

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL

QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE

30 NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLV
RPEV

DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA
CLLP

35 KLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT
DLTK

VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE
MPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETT
LEKC

40 CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNALIVRYTKKVPQ
VST

PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTES

45 LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
AT

KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 139

Вариант петли FG 309 (с мутацией RR->RS); может присутствовать в конструктах

342

RSGDMSSNPA

SEQ ID NO: 140

Линкер 2GX – (Gly4X)₂; X = Ala, Gly, Leu, Ile, Val

GGGGXGGGGX

SEQ ID NO: 141

Линкер 3GX – (Gly4X)₃; X = Ala, Gly, Leu, Ile, Val

GGGGXGGGGXGGGGX

SEQ ID NO: 142

Линкер G10 – (Gly4Gly)₂

GGGGGGGGGG

SEQ ID NO: 143

Линкер G15 – (Gly4Gly)₃

GGGGGGGGGGGGGGGG

SEQ ID NO: 144

342-G10-HSAC34S, моновалентный конструкт 2, линкеры полностью состоят из Gly
HSA подчеркнутSQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPDRTTIDLWYHHAHYSIGNL
KPDTEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHREKDLGEENFKA
LVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLYNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRIVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE

IARR

HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCA
SLQKFGERAFKAWAVARLSQREPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV
EEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE

AKR

MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKA
DDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 145

342-G15-342-G10-HSAC34S, бивалентный конструкт 2, линкеры полностью состоят
из Gly

HSA подчеркнут

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPDRTTIDLWYHHAHYSIGNL
KPDTEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTT
ALI

TWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTHEYEVSLICRSG
DMS

SNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPF
EDHV

5 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNE

CFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFF
AKR

10 YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWA
VARLS

QRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKE
CCE

KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYAR
RHPD

15 YSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQ
LGE

YKFQNALIVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQL

20 CVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE
KE

RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL
VAASQ

AALGL

SEQ ID NO: 146

25 Клон 342 - вариант с созревшей аффинностью (с вариантом петли FG, RR->RS
подчеркнуто)

IEVKDVTDTTALITWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
DTE

YEVSLICRSGDMSSNPAKETFTT

30 SEQ ID NO: 147

Линкерный модуль Gly-Ser, $(G_4S)_n$, где $n = 1-7$; показан модуль $(G_4S)_n$, где $n=1$

GGGGS

SEQ ID NO: 148

Линкерный модуль Gly, $(G_5)_n$, где $n = 1-7$; показан модуль $(G_5)_n$, где $n=1$

35 GGGGG

SEQ ID NO: 149

Линкерный модуль Gly-Ala, $(G_4A)_n$, где $n = 1-7$; показан модуль $(G_4A)_n$, где $n=1$

GGGGA

40 SEQ ID NO: 150

Полигистидиновая метка (H_8) - необязательный компонент Тn3-каркасных структур,
пригодный для очистки, можно объединять с дополнительными остатками линкера.

NNNNNNNN

SEQ ID NO: 151

45 Линкер, соединенный с полигистидиновой меткой - необязательный компонент Тn3-
каркасных структур, пригодный для очистки

GGGGSHNNNNNNNN

SEQ ID NO: 152

Зрелый MSA дикого типа

EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVAD
ESAA

NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERP

5 EA

EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES
CLTP

KLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLAT
DLTK

10

VNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHD
TMPA

DLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATL
EKC

CAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAP

15 QVST

PTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCC
SGS

LVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEVKKHKPK
AT

20

AEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

SEQ ID NO: 153

Зрелый MSA-C34S/C579S с мутацией по Cys; остатки, появившиеся в результате
мутации, подчеркнуты

EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYL

25 QKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAA

NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERP

EA

EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES
CLTP

30

KLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLAT
DLTK

VNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHD
TMPA

DLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATL

35 EKC

CAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAP

QVST

PTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCC
SGS

40

LVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEVKKHKPK
AT

AEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDALA

SEQ ID NO: 154

Клон M13; петли BC, DE, FG подчеркнуты

45

IEVKDVTDTTALITWHDAFGYDEFGCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDHEHNYSIGNLKPD
EYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 155

Клон M13N49Q; мутация N49Q подчеркнута

IEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
EYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 156

Бивалентный конструктор M13N49Q-1GS-M13N49Q; мутация N49Q подчеркнута

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTTGGGGSRDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDAF
GY

DFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTEYEVSLICANDHGFDSNPAK
ET

FTT

SEQ ID NO: 157

Моновалентный конструктор M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S; мутации подчеркнуты

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGE

QHF

KGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLC
AIPN

LRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMG
HYL

HEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ
RMK

CSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECAD
DRAE

LAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV

CKNY

AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAE
FQP

LVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT
KCCT

LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETY
VP

KEFKAETFTFHS^DICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD^DFAQFLD
TCC

KAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDALA

SEQ ID NO: 158

Бивалентный конструктор M13N49Q-1GS-M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S; мутации
подчеркнуты

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTTGGGGSRDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDAF

GY

DFGCELT^YGIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTEYEVSLICANDHGFDSNPAK
ET

FTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF^KGLVLIAFSQYL
QKSSYDEHAKL

VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPER
NECF

LQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAE
QYN

EILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVAR
LSQT

FPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCC
DKP

5 LLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRH
PDYS

VSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKL
EYG

10 FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR
VCL

LHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKE
KQ

IKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFQAFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLV
TRSKDA

15 LA

SEQ ID NO: 159

Клон M31; петли BC, DE, FG подчеркнуты

IEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGYIKDVPGDRTTIDLPDHFHNYSIGNLKPDTE
YEVSLICANDHGFDSYPAKETFTT

20 SEQ ID NO: 160

Клон M31N49Q; мутация N49Q подчеркнута

IEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGYIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTE
YEVSLICANDHGFDSYPAKETFTT

SEQ ID NO: 161

25 Бивалентный конструктор M31N49Q-1GS-M31N49Q; мутация N49Q подчеркнута

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGYIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSRDLAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPS

GY

DFWCELTGYIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTEYEVSLICANDHGFDSYPAK

30 ET

FTT

SEQ ID NO: 162

Моновалентный конструктор M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S; мутации подчеркнуты

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGYIKDVPGDRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGE

35 QHF

KGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLC

AIPN

LRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMG

40 HYL

HEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ

RMK

CSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECAD

DRAE

45 LAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV
CKNY

AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAE

FQP

LVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT
KCCT

LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETY
VP

5 KEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQFLD
TCC

KAADKDTCTFSTEGPNLVTRSKDALA

SEQ ID NO: 163

Бивалентный конструктор M31N49Q-1GS-M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S; мутации
10 подчеркнуты

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLDPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSRDLAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPS
GY

DFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLDPDHFHQYSIGNLKPDTEYEVSLICANDHGFDSYPAK
15 ET

FTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYL

QKSSYDEHAKL

VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPER
NECF

20 LQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAE
QYN

EILTQCCAADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVAR
LSQT

FPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCC
25 DKP

LLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRH
PDYS

VSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKL
EYG

30 FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR
VCL

LHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKE
KQ

IKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQFLDTCCKAADKDTCTFSTEGPNLV
35 TRSKDA

LA

SEQ ID NO: 164

Клон D1 - отрицательный контроль Tn3

IEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLK

40 PD

TEYEVSLICPNYERISNPAKETFTTT

SEQ ID NO: 165

Бивалентный конструктор D1-1GS-D1-3G-MSA-C34S/C579S; мутации подчеркнуты

SQIEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGN

45 LK

PDTEYEVSLICPNYERISNPAKETFTTTGGGGSRDLAPSQIEVKDVTDTTALITWSPGER
IWMFTGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLKPDTEYEVSLICPNYERISN

AK

ETFTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF~~KGLV~~LIAFSQYL
QKSSYDEHA

KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEP
ERNE

5 CFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFM~~GHYL~~HEVARRHPYFYAPELLY
AEQ

YNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAV
ARLS

QTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQT
10 CCD

KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSR
RHPD

YSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEK
LGE

15 YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAIL
NRV

CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPE
KE

KQIKKQTALAE~~LV~~KHKPKATAEQLKTVMD~~DF~~AQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLV
20 TRSK

DALA

SEQ ID NO: 166

Клон 342 с мутацией замены RDG на SDG; мутация подчеркнута

IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELT~~YGI~~KDVPGDRTTIDLWYHNAHYSIGNLKP

25 DTE

YEVSLICRSGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 167

Консенсусная последовательность 309FGwt

30 Все цепи представляют собой цепи исходного Tn3; бета-цепь C представляет собой
вариант CELTYGI (SEQ ID NO: 14); петли AB, CD, EF представляют собой петли
исходного Tn3

X1= Ser или Leu

X2= Asp или Glu

X3= His, Ile, Val, Phe или Trp

35 X4= Ala, Gly, Glu или Asp

X5= Glu, Leu, Gln, Ser, Asp или Asn

X6= Phe или Tyr

X7= Ile, Val, His, Glu или Asp

X8= Gly, Trp или Val

40 X9= Trp, Phe или Tyr

X10= Ser, Gln, Met или His

X11= Trp или His

X12= Arg или Ser

IEVKDVTDTTALITWX1DX2X3X4X5X6X7X8CELT~~YGI~~KDVPGDRTTIDLWX9HX10A

45 X11YSIGNLKPDT~~EY~~EVSLICRX12GDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO: 168

Консенсусная последовательность 309FGwt, петля BC

X1= Ser или Leu

X2= Asp или Glu
 X3= His, Ile, Val, Phe или Trp
 X4= Ala, Gly, Glu или Asp
 X5= Glu, Leu, Gln, Ser, Asp или Asn

5 X6= Phe или Tyr
 X7= Ile, Val, His, Glu или Asp
 X8= Gly, Trp или Val

X1DX2X3X4X5X6X7X8
 SEQ ID NO: 169

10 Консенсусная последовательность 309FGwt, петля DE

X9= Trp, Phe или Tyr
 X10= Ser, Gln, Met или His
 X11= Trp или His

WX9HX10AX11

15 SEQ ID NO: 170

Консенсусная последовательность 309FGwt, петля FG

X12= Arg или Ser
 RX12GDMSSNPA
 SEQ ID NO: 171

20 Консенсусная последовательность 311; все цепи представляют собой цепи исходного Tn3; два варианта бета-цепи C (SEQ ID NO: 13 и 14); петля CD представляет собой петлю исходного Tn3

X1= Lys или Glu

X2= Thr или Ile

25 X3= Asn или Ala

X4= Ser, Leu, Ala, Phe или Tyr

X5= Tyr, Ala, Gly, Val, Ile или Ser (контакт петли BC и N-конца)

X6= Tyr, Ser, Ala или His

X7= Asn, Asp, His или Tyr

30 X8= Leu, Phe, His или Tyr

X9= His, Pro, Ser, Leu или Asp

X10= Gly, Phe, His или Tyr

X11= Ala или Thr

X12= Ser, Asn, Glu, Arg или Asp

35 X13= Ser, Gln, Thr, Asn или Ala

X14= Pro, Val, -, Ile или Ala (- отсутствие аминокислоты)

X15= - или Ile (- отсутствие аминокислоты)

X16= Glu или Lys

X17= Ser или Asn

40 IEVX1DVTDTTALITWX2X3RSX4X5X6X7X8X9X10CEX11YGIKDVPDRTTIDLX1
 2X13X14X15YVHYSIGNLKPDTX16YEVSLICLTDDGTXYX17NPAKETFTT

SEQ ID NO: 172

Консенсусная последовательность 311; бета-цепь C клонов из семейства 311

X11= Ala или Thr

45 CELX11YGI

SEQ ID NO: 173

Консенсусная последовательность 311; петля AB

X1= Lys или Glu

X1DVTDTT

SEQ ID NO: 174

Консенсусная последовательность 311; петля BC

X2= Thr или Ile

5 X3= Asn или Ala

X4= Ser, Leu, Ala, Phe или Tyr, X5= Tyr, Ala, Gly, Val, Ile или Ser (контакт петли BC и N-конца)

X6= Tyr, Ser, Ala или His

X7= Asn, Asp, His или Tyr

10 X8= Leu, Phe, His или Tyr

X9= His, Pro, Ser, Leu или Asp

X10= Gly, Phe, His или Tyr

X2X3RSX4X5X6X7X8X9X10

SEQ ID NO: 175

15 Консенсусная последовательность 311; петля DE

X12= Ser, Asn, Glu, Arg или Asp, X13= Ser, Gln, Thr, Asn или Ala

X14= Pro, Val, -, Ile или Ala (- отсутствие аминокислоты)

X15= - или Ile (- отсутствие аминокислоты)

X12X13X14X15YVH

20 SEQ ID NO: 176

Консенсусная последовательность 311; петля EF

X16= Glu или Lys

GNLKPDTX16

SEQ ID NO: 177

25 Консенсусная последовательность 311; петля FG

X17= Ser или Asn

LTTDGTXYX17NPA

SEQ ID NO: 178

BC9 NHT oligo; петля BC

30 Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T.

ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGGCTGTGAACTGA
CCTAT

GGCATTA AAA

35 SEQ ID NO: 179

BC11 NHT oligo; петля BC

Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T.

ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTNHTNHTNHTNHTNHTNHTNHTGGCTGTG
40 AACTG

ACCTATGGCATTA AAA

SEQ ID NO: 180

BC12 NHT oligo; петля BC

45 Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T.

ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRRCRGCNHTVTTNHTGGC
TGTGAA

CTGACCTATGGCATTA AAA

SEQ ID NO: 181

DE NHT oligo; петля DE

Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G;
M = A/C; K = G/T.

5 CGATCGCACCAACCATAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTNHTTATAGCATTGGTAAC
CTGAA
ACCG

SEQ ID NO: 182

FG9 NHT oligo; петля FG

10 Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G;
M = A/C; K = G/T.

GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTNHTKCGAAA
GAAACC
TTTACCACCGGTG

15 SEQ ID NO: 183

FG10 NHT oligo; петля FG

Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G;
M = A/C; K = G/T.

GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTNHTNHTNHTRGCNHTCCGGCG
20 AAAGAA
ACCTTTACCACCGGTG

SEQ ID NO: 184

Олигонуклеотид FG11 NHT; петля FG

Коды нуклеотидов: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G;
25 M = A/C; K = G/T.

GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTAGCAACCCG
GCGAAA
GAAACCTTTACCACCGGTG

SEQ ID NO: 185

30 Олигонуклеотид BCX-DE bridge v2

CAGATCTATGGTGGTGGCGATCGCCCGGCACATCTTTAATGCCATAGGTCAGTTCA
CA

SEQ ID NO: 186

Олигонуклеотид DE-FGX bridge v2

35 GCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGGTATCCGGTTTCAGGTTACCAATGCTAT

SEQ ID NO: 187

Олигонуклеотид KpnI amp rev v2

CGGGTCGGTTGGGGTACCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTT

SEQ ID NO: 188

40 Олигонуклеотид KpnI reverse v2

CGGGTCGGTTGGGGTA

SEQ ID NO: 189

Олигонуклеотид BC library amp v2

GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATAACCACCGC
45 GCTGAT

TACCTGG

SEQ ID NO: 190

Олигонуклеотид BC9 PCR

Коды нуклеотидов: 1= кодоны для всех 19aa(-cys); 2=кодоны для Ala/Pro 50/50; 3= кодоны для Ala/Gly

ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAGA
TG

5 SEQ ID NO: 191

Олигонуклеотид BC 9-loop NNK

Коды нуклеотидов: K= 50%G/50%T

ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNNKGSTNNKNNKNNKGGCTGTGAACTG
ACCTA

10 TGGCATTA AAA

SEQ ID NO: 192

Олигонуклеотид 309 BC-loop NNKdope

Коды нуклеотидов: 4= 70%G10%A10%C10%T; 5= 10%G,70%A,10%C,10%T; 6= 10%G,10%A,70%C, 10%T; 7= 10%G,10%A,10%C,70%T; 8= 70%A15%C15%T и K= 50%G/
15 50%T

ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78T45K44KTGTGAACTGACCTA
TGGCATTA AAA

SEQ ID NO: 193

Олигонуклеотид DE PCR

20 Коды нуклеотидов: 1= кодоны для всех 19aa(-cys)

GATGTGCCGGGCGATCGCACCACCATAGATCTG11111TATAGCATTGGTAACCT
GAAA

CCGG

SEQ ID NO: 194

25 Олигонуклеотид Upstr BCloop Rev

CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT

SEQ ID NO: 195

Олигонуклеотид BC shuffle rev

CAGATCTATGGTGGTGGCGATCGC

30 SEQ ID NO: 196

Олигонуклеотид DE shuffle FWD

TGTGAACTGACCTATGGCATTAAGATGT

SEQ ID NO: 197

Олигонуклеотид BC11-311Gly

35 Коды нуклеотидов: 1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T; 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T; 3= 10%G, 10%A, 70%C, 10%T; 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T; 5=70%A, 15%C, 15%T; 6=15%A, 70%C, 15%T; 7=15%A, 15%C, 70%T; V=33%A, 33%C, 33%G.

ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TGGCTGTGAACTG
ACCTATGGCATTA AAA

40 SEQ ID NO: 198

Олигонуклеотид BC11-311NHT

Коды нуклеотидов: 1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T; 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T; 3= 10%G, 10%A, 70%C, 10%T; 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T; 5=70%A, 15%C, 15%T; 6=15%A, 70%C, 15%T; 7=15%A, 15%C, 70%T; V=33%A, 33%C, 33%G; и H=33%A, 33%C, 33%T

45 ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TNHTTGTGAACTG
ACCTATGGCATTA AAA

SEQ ID NO: 199

Олигонуклеотид BC library amp K4E

GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGGAAGATGTGACCGATACCACCGC
GCTGAT

TACCTGG

SEQ ID NO: 200

5 Вариант HSA с увеличенным временем полужизни (C34S, L463N, K524L); мутации подчеркнуты

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL

QQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE

NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP¹⁰NLPRLV

RPEV

DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA

CLLP

KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVT

DLTK

15 VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE
MPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV²⁰VLLRLAKTYETT

LEKC

CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ

20 VST

PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL

CVNHEKTPVSDRVTKCCTES

LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQILKQTALVELVKHKPKAT

KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

25 SEQ ID NO: 201

Моновалентный конструктор, представляющий собой вариант 311K4E₁₂-I (содержит линкер GS и HSA C34S); линкер и серин, появившийся в результате мутации, подчеркнуты

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGN

LK

30 PDTEYEVSLICLTDDGTYN³⁵NPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL

VLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT

LRE

TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP⁴⁰NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY

LYEI

35 ARRHHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA⁴⁵CLLPKLDEL⁵⁰RDEGKASSAKQRL

KCAS

LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLV⁵⁵TDLT⁶⁰KVHTECCHGDLLECADDRA

DLAK

YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA

40 EA

KDVFLGMFLYEYARRHPDYSV⁴⁵VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFK

PLVE

EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKK

HPE

45 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYV

PKEF

NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC

CKAD

DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 202

Моновалентный конструктор, представляющий собой вариант 311K4E_12-I (содержит вариант CELTYG бета-цепи С, линкер, полностью состоящий из G, и HSA C34S); линкер и серин, появившийся в результате мутации, подчеркнуты

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGN
LK

PDTEYEVSLICLTDDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVAT

LRE

TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY
LYEI

ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRL
KCAS

LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRA
DLAK

YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA
EA

KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFK

PLVE

EPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCK
HPE

AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYV
PKEF

NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAIVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC
CKAD

DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 203

Бивалентный конструктор, представляющий собой вариант 311K4E_12-I (содержит линкеры GS и HSA C34S); линкеры и серин, появившийся в результате мутации, подчеркнуты

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGN
LK

PDTEYEVSLICLTDDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTTEYEVSLI

CL

TTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY
LQQS

PFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC

CAKQ

EPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYA
PEL

LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERA
FKAW

AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI
SSK

LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMF
LYEY

ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN
CEL

FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYLS

5 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA
DIC

TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE
EGKK

LVAASQAALGL

10 SEQ ID NO: 204

Бивалентный конструктор, представляющий собой вариант 311K4E_12-I (содержит
линкеры, полностью состоящие из G, и HSA S34); линкеры и серин, появившийся в
результате мутации, подчеркнуты

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGYIKDVPDRTTIDLNPYVHYSIGN

15 LK

PDTEYEVSLICLTDDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNPYVHYSIGNLKPDTTEYEVSLI
CL

TTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY

20 LQQS

PFEDHVKLNVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC
CAKQ

EPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYA
PEL

25 LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERA
FKAW

AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI
SSK

LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMF

30 LYEY

ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN
CEL

FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYLS

35 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA
DIC

TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE
EGKK

LVAASQAALGL

40 SEQ ID NO: 205

Бивалентный конструктор 309-3GS-309

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPDRTTIDLWWHSAWYSIGNL
KPD

TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTT

45 ALI

TWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDTTEYEVSLICYTD
QEA

GNPAKETFTT

SEQ ID NO: 206

Моновалентный конструкт 309-2GS-HSAC34S

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGKIDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNL
KPD5 TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKA
LVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYG10 EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRIVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCA
SLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYIC15 ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV
EEPQ20 NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAIVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKA
DDKE

25 TCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 207

Бивалентный конструкт 309-3GS-309-2GS-HSAC34S

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGKIDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNL
KPD30 TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTT
ALITWSDEFGHYDGCELTGKIDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDTEYEVSLICYTD
QEA35 GNPaketFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAIVLIAFAQYL
QQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNECFLQHKDDNPNLPRIVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPELLF
AKR40 YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCAVSLQKFGERAFKAWA
VARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKEVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKE
CCE45 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQ
LGE

YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV

LNQL

CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE
KE

RQIKKQTAIVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL

5 VAASQ

AALGL

SEQ ID NO: 208

Бивалентный конструктор 342-3GS-342

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPDRTTIDLWYHHAHYSIGNL

10 KPD

TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTT
ALITWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSG
DMS

15 SNPAKETFTT

SEQ ID NO: 209

Линкерный модуль Gly-Ser, $(G_4X)_n$, где X=G, S, A, L, I или V и n = 1-7; показан модуль
 $(G_4X)_n$, где n=1

GGGGX

20

SEQ ID NO: 210

Мутантная форма L25/M сигнального пептида OppA

MTNITKRSLVAAGVLAALMAGNVAMA

(57) Формула изобретения

25 1. Тн3-каркасная структура, специфически связывающаяся с CD40L и содержащая
две CD40L-специфичные мономерные субъединицы,где каждая мономерная субъединица содержит семь бета-цепей, обозначенных A, B,
C, D, E, F и G, и шесть петлевых участков, обозначенных AB, BC, CD, DE, EF и FG,30 где бета-цепи и петлевые участки каждой мономерной субъединицы находятся в
порядке от N-конца до C-конца: A-бета-цепь, петля AB, B-бета-цепь, петля BC, C-бета-
цепь, петля CD, D-бета-цепь, петля DE, E-бета-цепь, петля EF, F-бета-цепь, петля FG, G-
бета-цепь,35 где петля AB представляет собой SEQ ID NO: 4, петля BC представляет собой SEQ
ID NO: 86, петля CD представляет собой SEQ ID NO: 6, петля DE представляет собой
SEQ ID NO: 96, петля EF представляет собой SEQ ID NO: 8, а петля FG представляет
собой SEQ ID NO: 9 или 139,40 где две мономерные субъединицы соединены в тандем посредством пептидного
линкера, причем указанный пептидный линкер содержит аминокислотную
последовательность $(G_mX)_n$, где X представляет собой серин (S), аланин (A), глицин
(G), лейцин (L), изолейцин (I) или валин (V); m и n представляют собой целые числа, где
m равно 1, 2, 3 или 4, n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.2. Тн3-каркасная структура по п.1, где пептидный линкер содержит SEQ ID NO: 131,
SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143.

45 3. Тн3-каркасная структура по п.1, где

(a) A-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 11;

(b) B-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 12;

(c) C-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 13 или 14;

(d) D-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 15;

(e) E-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 16;

(f) F-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 17 и

(g) G-бета-цепь содержит SEQ ID NO: 18.

4. Tn3-каркасная структура по п.1, где каждая мономерная субъединица содержит SEQ ID NO: 146.

5. Tn3-каркасная структура по п.1, где каждая мономерная субъединица содержит SEQ ID NO: 208.

6. Tn3-каркасная структура по п.1 или 2, где каждая мономерная субъединица содержит аминокислотную последовательность:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELEX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_n
YEVSILIC(X_{FG})_nKETFTT,

где

(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG соответственно;

(b) X₁ представляет собой аминокислотный остаток A или T и

(c) длина петли n представляет собой целое число от 2 до 26.

7. Конъюгат Tn3-каркасной структуры, который специфически связывается с CD40L и содержит Tn3-каркасный белок, соединенный с гетерологичным фрагментом,

где Tn3-каркасный белок содержит:

две CD40L-специфичные мономерные субъединицы, где каждая мономерная субъединица содержит семь бета-цепей, обозначенных A, B, C, D, E, F и G, и шесть петлевых участков, обозначенных AB, BC, CD, DE, EF и FG,

где бета-цепи и петлевые участки каждой мономерной субъединицы находятся в порядке от N-конца до C-конца: A-бета-цепь, петля AB, B-бета-цепь, петля BC, C-бета-цепь, петля CD, D-бета-цепь, петля DE, E-бета-цепь, петля EF, F-бета-цепь, петля FG, G-бета-цепь,

где петля AB представляет собой SEQ ID NO: 4, петля BC представляет собой SEQ ID NO: 86, петля CD представляет собой SEQ ID NO: 6, петля DE представляет собой SEQ ID NO: 96, петля EF представляет собой SEQ ID NO: 8, а петля FG представляет собой SEQ ID NO: 9 или 139,

где две мономерные субъединицы соединены в тандем посредством пептидного линкера, причем указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (G_mX)_n, где X представляет собой серин (S), аланин (A), глицин

(G), лейцин (L), изолейцин (I) или валин (V); m и n представляют собой целые числа, где m равно 1, 2, 3 или 4, n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

где гетерологичный фрагмент представляет собой белок, пептид, белковый домен, линкер, лекарственное средство, токсин, цитотоксическое средство, визуализирующее средство, радионуклид, радиоактивное соединение, органический полимер,

неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, человеческий сывороточный альбумин (HSA), участок, отвечающий за связывание HSA с FcRn, антитело, домен антитела, фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, антитело на основе домена, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасную структуру, отличающуюся от FnIII, эпитопную метку,

рекомбинантный полипептидный полимер или цитокин.

8. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где гетерологичный фрагмент соединен с N-концом или C-концом каркасной структуры.

9. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.8, где гетерологичный фрагмент соединен

с каркасом вторым пептидным линкером.

10. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.9, где второй пептидный линкер представляет собой гибкий пептидный линкер.

11. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.9 или 10, где второй пептидный линкер
5 содержит последовательность $(G_mX)_n$, где

(a) X представляет собой серин (S), аланин (A), глицин (G), лейцин (L), изолейцин (I) или валин (V);

(b) m и n представляют собой целые числа;

(c) m равно 1, 2, 3 или 4 и

10 (d) n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

12. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.11, где второй пептидный линкер содержит SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 или SEQ ID NO: 143.

13. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где гетерологичный фрагмент представляет собой PEG.

14. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.9, где гетерологичный фрагмент
15 представляет собой альбумин.

15. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.14, где альбумин представляет собой сывороточный альбумин человека (HSA).

16. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.15, где указанный HSA представляет
20 собой вариант HSA.

17. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.16, где аминокислотная последовательность указанного варианта HSA представляет собой SEQ ID NO: 133.

18. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.16, где вариант HSA содержит
25 последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее фрагмент за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из:

(a) замены лейцина (L) в положении 407 на аспарагин (N) или тирозин (Y);

(b) замены валина (V) в положении 415 на треонин (T);

30 (c) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N);

(d) замены лизина (K) в положении 500 на аргинин (R);

(e) замены треонина (T) в положении 506 на тирозин (Y);

(f) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R);

35 (g) замены фенилаланина (F) в положении 509 на метионин (M) или триптофан (W);

(h) замены аланина (A) в положении 511 на фенилаланин (F);

(i) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 512 на тирозин (Y);

(j) замены треонина (T) в положении 515 на глутамин (Q);

(k) замены лейцина (L) в положении 516 на треонин (T) или триптофан (W);

(l) замены аргинина (R) в положении 521 на триптофан (W);

40 (m) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R);

(n) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L);

(o) замены глутамина (Q) в положении 526 на метионин (M);

(p) замены гистидина (H) в положении 535 на пролин (P);

45 (q) замены аспарагиновой кислоты (D) в положении 550 на глутаминовую кислоту (E);

(r) замены лизина (K) в положении 557 на глицин (G);

(s) замены лизина (K) в положении 573 на фенилаланин (F), гистидин (H), пролин (P),

триптофан (W) или тирозин (Y);

(t) замены лизина (K) в положении 574 на аспарагин (N);

(u) замены глутамина (Q) в положении 580 на лизин (K) и

(v) комбинации двух или более указанных замен,

5 где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с указанным вариантом HSA.

19. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.18, где вариант HSA содержит последовательность полноразмерного зрелого HSA (SEQ ID NO: 133 или 138) или ее
10 фрагмент за исключением по меньшей мере одной аминокислотной замены, пронумерованной относительно положения в полноразмерном зрелом HSA, выбранной из группы, состоящей из:

(a) замены лейцина (L) в положении 463 на аспарагин (N);

(a) замены треонина (T) в положении 508 на аргинин (R);

15 (с) замены изолейцина (I) в положении 523 на аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лизин (K) или аргинин (R);

(d) замены лизина (K) в положении 524 на лейцин (L) и

(е) комбинации двух или более указанных замен,

где указанная Tn3-каркасная структура имеет более длительное время полужизни в
20 плазме, чем время полужизни в плазме Tn3-каркасной структуры, не являющейся конъюгированной с указанным вариантом HSA.

20. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-19, где

(a) бета-цепь A содержит SEQ ID NO: 11;

(b) бета-цепь B содержит SEQ ID NO: 12;

25 (с) бета-цепь C содержит SEQ ID NO: 13 или 14;

(d) бета-цепь D содержит SEQ ID NO: 15;

(е) бета-цепь E содержит SEQ ID NO: 16;

(f) бета-цепь F содержит SEQ ID NO: 17 и

(g) бета-цепь G содержит SEQ ID NO: 18.

30 21. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-19, где каждая мономерная субъединица содержит аминокислотную последовательность:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELY₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_n

YEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT,

где

35 (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} и X_{FG} представляют собой аминокислотные остатки, присутствующие в последовательностях петель AB, BC, CD, DE, EF и FG соответственно;

(b) X₁ представляет собой аминокислотный остаток A или T и

(с) длина петли n представляет собой целое число от 2 до 26.

40 22. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-19, где каждая мономерная субъединица содержит SEQ ID NO: 146.

23. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где белок Tn3-каркасной структуры содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 134, 135, 144, 145, 146 и 208.

45 24. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где белок Tn3-каркасной структуры состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135, 145 и 208.

25. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где указанный CD40L представляет

собой CD40L человека.

26. Конъюгат Tn3-каркасной структуры по п.7, где указанный CD40L представляет собой мембраносвязанный CD40L (SEQ ID NO: 1), растворимый CD40L (SEQ ID NO: 2) или его фрагмент.

5 27. Способ ингибирования взаимодействия между CD40L и CD40 в клетке, экспрессирующей CD40L, предусматривающий приведение в контакт клетки с Tn3-каркасной структурой по любому из пп.1-6 или конъюгатом Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-26.

10 28. Способ снижения CD40-опосредованного сигнального ответа, предусматривающий приведение в контакт клетки, экспрессирующей CD40L, с Tn3-каркасной структурой по любому из пп.1-6 или конъюгатом Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-26, где Tn3-каркасная структура связывается с CD40L и нарушает CD40-опосредованный сигнальный путь.

15 29. Способ по п.28, отличающийся тем, что CD40-опосредованный сигнальный ответ представляет собой T-зависимый иммунный ответ.

30. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая Tn3-каркасную структуру по любому из пп.1-6.

31. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.30.

20 32. Клетка-хозяин для экспрессии Tn3-каркасной структуры по любому из пп.1-6, где клетка-хозяин является одной из: бактериальной клеткой, клеткой COS, клеткой СНО, клеткой 3ТЗ, клеткой NSO или клеткой ВНК и где указанная клетка-хозяин содержит вектор по п.31.

33. Способ получения Tn3-каркасной структуры, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п.32 в условиях, при которых экспрессируется Tn3-каркасная структура, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты.

34. Композиция для уменьшения CD40-опосредованного иммунного ответа, содержащая Tn3-каркасную структуру по любому из пп.1-6 в количестве, достаточном для достижения терапевтического ответа, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

30 35. Способ лечения, уменьшения интенсивности, управления течением аутоиммунного заболевания у нуждающегося пациента, предусматривающий введение эффективного количества композиции по п.34.

36. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конъюгат Tn3-каркасной структуры по любому из пп.14-19.

37. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.36.

35 38. Клетка-хозяин для экспрессии конъюгата Tn3-каркасной структуры по любому из пп.14-19,

где клетка-хозяин является одной из: бактериальной клеткой, клеткой COS, клеткой СНО, клеткой 3ТЗ, клеткой NSO или клеткой ВНК и

где клетка-хозяин содержит вектор по п.37.

40 39. Способ получения конъюгата Tn3-каркасной структуры, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п.38 в условиях, при которых экспрессируется конъюгат Tn3-каркасной структуры, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты.

40 40. Композиция для уменьшения CD40-опосредованного иммунного ответа, содержащая конъюгат Tn3-каркасной структуры по любому из пп.7-24 в количестве, достаточном для достижения терапевтического ответа, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

41. Способ лечения, уменьшения интенсивности, управления течением аутоиммунного заболевания у нуждающегося пациента, предусматривающий введение эффективного

количества композиции по п.40.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MedImmune LLC

<120> CD40L-СПЕЦИФИЧНЫЕ TN3-КАРКАСНЫЕ СТРУКТУРЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ TN3, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> CD40L-101WO1

<160> 210

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160

2

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 2
<211> 149
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
1 5 10 15

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
20 25 30

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

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
50 55 60

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
65 70 75 80

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
85 90 95

3

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
100 105 110

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
115 120 125

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
130 135 140

Gly Leu Leu Lys Leu
145

<210> 3
<211> 83
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 3

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe
1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 4
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 4

4

Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 5

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 6

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 7

Thr Glu Asp Glu Asn Gln
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 8

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
1 5

5

<210> 9
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 9

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 11

Ile Glu Val
 1

<210> 12
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 12

Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

6

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 13

Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile
 1 5

<210> 14
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 14

Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 15

Thr Thr Ile Asp Leu
 1 5

<210> 16
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 16

Tyr Ser Ile
 1

<210> 17
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 17

7

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 18

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
1 5

<210> 19
<211> 98
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 19

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
50 55 60

Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 20
<211> 83
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

8

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 20

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 21

<211> 98

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 21

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
 35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

His His

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 22

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 23

Ser Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
20 25 30

10

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

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

His His

<210> 24
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 24

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Met Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 25
 <211> 98
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

11

<223> синтетическая конструкция

<400> 25

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
 35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

His His

<210> 26

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 26

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

12

Phe Thr Thr

<210> 27
 <211> 98
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 27

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

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

Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

His His

<210> 28
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 28

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

13

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 29

<211> 98

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 29

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
20 25 30

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

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 30

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

14

<223> синтетическая конструкция

<400> 30

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Gln Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 31

<211> 98

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 31

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Glu Val Gly Asp Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

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

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

15

His His

<210> 32
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 32

Ile	Glu	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Trp	Ser
1				5					10					15	

Asp	Glu	Val	Gly	Asp	Tyr	Val	Val	Cys	Glu	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ile	Lys
			20					25					30		

Asp	Val	Pro	Gly	Asp	Arg	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Trp	Tyr	His	Met	Ala
		35					40					45			

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

Leu	Ile	Cys	Arg	Arg	Gly	Asp	Met	Ser	Ser	Asn	Pro	Ala	Lys	Glu	Thr
65					70					75				80	

Phe Thr Thr

<210> 33
 <211> 98
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 33

Ala	Ile	Glu	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Trp
1				5					10					15	

Ser	Asp	Asp	Phe	Ala	Glu	Tyr	Val	Gly	Cys	Glu	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ile
			20					25					30		

Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Asp	Arg	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Trp	Trp	His	Ser
		35				40					45				
Ala	Trp	Tyr	Ser	Ile	Gly	Asn	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Glu	Tyr	Glu	Val
	50					55					60				

16

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 34
<211> 83
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 34

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

Asp Asp Phe Ala Glu Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 35
<211> 98
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 35

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15
Ser Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
20 25 30

17

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 36
<211> 83
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 36

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 37
<211> 98
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

18

<223> синтетическая конструкция

<400> 37

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
20 25 30

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

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 38

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 38

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Met Ala
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

19

Phe Thr Thr

<210> 39
 <211> 98
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 39

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Phe His Gln
 35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

His His

<210> 40
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 40

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

20

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Phe His Gln Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 41
 <211> 98
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 41

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
 35 40 45

Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
 85 90 95

His His

<210> 42
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

21

<223> синтетическая конструкция

<400> 42

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 43

<211> 101

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 43

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

22

His His His His His
100

<210> 44
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 44

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 45
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 45

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

23

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 46
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 46

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 47
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 47

24

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

Ile Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Lys Tyr
50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 48

<211> 86

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 48

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile
1 5 10 15

Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

25

<210> 49
 <211> 102
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 49

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn
 65 70 75 80

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His
 85 90 95

His His His His His His
 100

<210> 50
 <211> 87
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 50

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

26

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 51
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 51

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His Cys Glu Leu Ala Tyr
20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 52
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 52

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile
1 5 10 15

27

Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 53

<211> 101

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 53

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 54

<211> 86

28

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 54

 Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

 Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
 20 25 30

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

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

 Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

 Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 55
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 55

 Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

 Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
 20 25 30

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

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

 Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

29

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 56
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 56

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 57
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 57

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 58
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 58

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 59
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

31

<400> 59

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 60

<211> 86

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 60

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

32

<210> 61
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 61

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 62
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 62

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile
 1 5 10 15
 Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

33

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 63
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 63

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 64
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 64

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

34

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 65
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 65

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 66
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 66

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 67

<211> 101

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 67

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

36

His His His His His
100

<210> 68
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 68

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 69
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 69

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

37

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 70
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 70

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 71
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 71

38

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 72

<211> 86

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 72

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

39

<210> 73
 <211> 100
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 73

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His
 85 90 95

His His His His
 100

<210> 74
 <211> 85
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 74

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

40

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

Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 75
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 75

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 76
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 76

41

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 77

<211> 101

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 77

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

42

<210> 78
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 78

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 79
 <211> 101
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 79

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

43

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His
100

<210> 80
<211> 86
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 80

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 81
<211> 101
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 81

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

44

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95

His His His His His
 100

<210> 82
 <211> 86
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 82

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 83
 <211> 9

45

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 83

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 84

Ser Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp
 1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 85

Ser Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp
 1 5

<210> 86
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 86

Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp
 1 5

<210> 87
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

46

<223> синтетическая конструкция

<400> 87

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val
 1 5

<210> 88

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 88

Ser Asp Glu Val Gly Asp Tyr Val Val
 1 5

<210> 89

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 89

Ser Asp Asp Phe Ala Glu Tyr Val Gly
 1 5

<210> 90

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 90

Ser Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val
 1 5

<210> 91

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 91

47

Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 92

Ser Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 93

Ser Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly
1 5

<210> 94
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 94

Trp Trp His Ser Ala Trp
1 5

<210> 95
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 95

Trp Tyr His Met Ala Trp
1 5

48

<210> 96
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 96

Trp Tyr His His Ala His
 1 5

<210> 97
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 97

Trp Tyr His Gln Ala Trp
 1 5

<210> 98
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 98

Trp Phe His Gln Ala Trp
 1 5

<210> 99
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 99

Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

49

<220>
 <223> синтетическая конструкция
 <400> 100
 Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly
 1 5 10

<210> 101
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция
 <400> 101

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly
 1 5 10

<210> 102
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция
 <400> 102

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly
 1 5 10

<210> 103
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция
 <400> 103

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His
 1 5 10

<210> 104
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция
 <400> 104

50

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly
 1 5 10

<210> 105
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 105

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly
 1 5 10

<210> 106
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 106

Thr Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly
 1 5 10

<210> 107
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 107

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly
 1 5 10

<210> 108
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 108

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly
 1 5 10

51

<210> 109
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 109

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly
 1 5 10

<210> 110
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 110

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu Pro Gly
 1 5 10

<210> 111
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 111

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly
 1 5 10

<210> 112
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 112

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr
 1 5 10

<210> 113
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

52

<220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 113

 Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His
 1 5 10

<210> 114
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 114

 Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly
 1 5 10

<210> 115
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 115

 Thr His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe
 1 5 10

<210> 116
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 116

 Thr Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly
 1 5 10

<210> 117
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 117

53

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly
 1 5 10

<210> 118
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 118

Ser Ser Pro Tyr Val His
 1 5

<210> 119
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 119

Asp Gln Ile Tyr Val His
 1 5

<210> 120
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 120

Ser Ala Ala Ile Tyr Val His
 1 5

<210> 121
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 121

Asn Ser Pro Tyr Val His
 1 5

<210> 122

54

<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 122

Asn Asn Ile Tyr Val His
1 5

<210> 123
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 123

Asn Gln Pro Tyr Val His
1 5

<210> 124
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 124

Arg Gln Pro Tyr Val His
1 5

<210> 125
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 125

Glu Leu Tyr Val His
1 5

<210> 126
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

55

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 126

Asn Thr Pro Tyr Val His
 1 5

<210> 127
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 127

Glu Gln Val Tyr Val His
 1 5

<210> 128
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 128

Asn Gln Val Tyr Val His
 1 5

<210> 129
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 129

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 1 5 10

<210> 130
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 130

56

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala
 1 5 10

<210> 131
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 131

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

<210> 132
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 132

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

<210> 133
 <211> 585
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 133

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

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

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	
				85					90					95		
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	
			100					105					110			
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	
		115					120					125				
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	
	130					135					140					
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	
				165					170					175		
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	
			180					185					190			
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	
		195					200					205				
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	
	210					215					220					
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	
				245					250					255		
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	
			260					265					270			
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	
		275						280				285				
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	
	290					295					300					
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	
305					310					315					320	

58

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210>	134
<211>	680
<212>	Белок
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 134

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
85 90 95

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
100 105 110

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
115 120 125

Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
130 135 140

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
145 150 155 160

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
165 170 175

60

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
 180 185 190

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
 195 200 205

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 210 215 220

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 225 230 235 240

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 245 250 255

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 260 265 270

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
 275 280 285

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
 290 295 300

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
 305 310 315 320

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
 325 330 335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
 340 345 350

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
 370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
 385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
 405 410 415

61

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
 420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
 435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
 450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
 465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
 485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
 500 505 510

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
 515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
 530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
 545 550 555 560

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
 565 570 575

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
 580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
 595 600 605

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
 610 615 620

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 625 630 635 640

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
 645 650 655

62

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 660 665 670

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 675 680

<210> 135
 <211> 785
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 135

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
 100 105 110

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu
 115 120 125

Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
 130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser
 165 170 175

63

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 195 200 205

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 210 215 220

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val
 225 230 235 240

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 245 250 255

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 260 265 270

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 275 280 285

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 290 295 300

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 305 310 315 320

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 325 330 335

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 340 345 350

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 355 360 365

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 370 375 380

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415

64

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 500 505 510

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 610 615 620

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 625 630 635 640

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 645 650 655

65

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
675 680 685

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
705 710 715 720

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
725 730 735

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
740 745 750

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
755 760 765

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
770 775 780

Leu
785

<210> 136
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 136

Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 137

66

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Lys
1 5

<210> 138
<211> 585
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 138

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

67

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

68

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 139
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 139

Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala
1 5 10

<210> 140
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

69

<223> синтетическая конструкция

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Leu, Ile и Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Leu, Ile и Val

<400> 140

Gly Gly Gly Gly Хаа Gly Gly Gly Gly Хаа
1 5 10

<210> 141

<211> 15

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Leu, Ile и Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Leu, Ile и Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Leu, Ile и Val

<400> 141

Gly Gly Gly Gly Хаа Gly Gly Gly Gly Хаа Gly Gly Gly Gly Хаа
1 5 10 15

<210> 142

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 142

70

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

<210> 143
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 143

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

<210> 144
 <211> 680
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 144

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp
 85 90 95

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
 100 105 110

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
 115 120 125

71

Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
 130 135 140

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
 145 150 155 160

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
 165 170 175

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
 180 185 190

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
 195 200 205

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 210 215 220

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 225 230 235 240

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 245 250 255

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 260 265 270

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
 275 280 285

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
 290 295 300

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
 305 310 315 320

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
 325 330 335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
 340 345 350

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
 355 360 365

72

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
 370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
 385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
 405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
 420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
 435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
 450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
 465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
 485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
 500 505 510

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
 515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
 530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
 545 550 555 560

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
 565 570 575

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
 580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
 595 600 605

73

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
610 615 620

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
625 630 635 640

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
645 650 655

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
660 665 670

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680

<210> 145

<211> 785

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 145

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
100 105 110

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu
115 120 125

74

Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
 130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser
 165 170 175

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 195 200 205

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 210 215 220

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val
 225 230 235 240

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 245 250 255

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 260 265 270

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 275 280 285

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 290 295 300

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 305 310 315 320

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 325 330 335

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 340 345 350

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 355 360 365

75

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 370 375 380

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 500 505 510

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605

76

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
610 615 620

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
625 630 635 640

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
645 650 655

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
675 680 685

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
705 710 715 720

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
725 730 735

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
740 745 750

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
755 760 765

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
770 775 780

Leu
785

<210> 146

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 146

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

77

Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 147
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa представляет собой любой из Ser, Ala, Gly, Leu, Ile, и Val

<400> 147

Gly Gly Gly Gly Xaa
 1 5

<210> 148
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 148

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 149
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

78

<223> синтетическая конструкция

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 150

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ala
1 5

<210> 151

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 151

His His His His His His His His
1 5

<210> 152

<211> 13

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 152

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

<210> 153

<211> 584

<212> Белок

<213> mus muscus

<400> 153

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

79

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
 100 105 110

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
 115 120 125

Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln
 145 150 155 160

Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser
 165 170 175

Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser
 180 185 190

Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro
 210 215 220

Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

80

Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His
 275 280 285

Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala
 290 295 300

Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys
 340 345 350

Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala
 355 360 365

Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

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

Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg
 420 425 430

Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys
 435 440 445

Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr
 485 490 495

81

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val
565 570 575

Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala
580

<210> 154
<211> 584
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 154

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
65 70 75 80

Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
100 105 110

82

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
 115 120 125

Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln
 145 150 155 160

Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser
 165 170 175

Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser
 180 185 190

Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro
 210 215 220

Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His
 275 280 285

Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala
 290 295 300

Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys
 340 345 350

83

Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala
 355 360 365

Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

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

Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg
 420 425 430

Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys
 435 440 445

Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val
 565 570 575

Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 580

84

<210> 155
 <211> 84
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 155

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 156
 <211> 84
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 156

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His
 35 40 45

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

85

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 157

<211> 183

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 157

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

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

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala
85 90 95

Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile
100 105 110

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

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp
130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro
165 170 175

86

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
180

<210> 158
<211> 685
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 158

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

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

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr
100 105 110

Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe
115 120 125

Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val
130 135 140

Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
145 150 155 160

Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
165 170 175

Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys
180 185 190

87

Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 195 200 205

Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met
 210 215 220

Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu
 225 230 235 240

His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu
 260 265 270

Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu
 275 280 285

Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met
 290 295 300

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320

Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala
 325 330 335

Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 340 345 350

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn
 355 360 365

Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu
 370 375 380

Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro
 385 390 395 400

Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val
 405 410 415

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu
 420 425 430

Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu
 435 440 445

88

Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu
 450 455 460

Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro
 465 470 475 480

Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr
 485 490 495

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr
 500 505 510

Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala
 515 520 525

Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp
 530 535 540

Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
 545 550 555 560

Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys
 565 570 575

Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 580 585 590

Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
 595 600 605

Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile
 610 615 620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 625 630 635 640

Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu
 645 650 655

Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu
 660 665 670

Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 675 680 685

89

<210> 159
 <211> 782
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 159

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

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

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala
 85 90 95

Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile
 100 105 110

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

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp
 130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
 145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro
 165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 180 185 190

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg
 195 200 205

90

Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala
 210 215 220

Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu
 225 230 235 240

Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 245 250 255

Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 260 265 270

Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys
 275 280 285

Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 290 295 300

Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala
 305 310 315 320

Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr
 325 330 335

Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 340 345 350

Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala
 355 360 365

Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys
 370 375 380

Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser
 385 390 395 400

Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 405 410 415

Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu
 420 425 430

Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 435 440 445

91

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460

Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro
 465 470 475 480

Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met
 485 490 495

Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu
 500 505 510

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

Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu
 530 535 540

Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 545 550 555 560

Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln
 565 570 575

Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu
 580 585 590

Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg
 595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala
 610 615 620

Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu
 625 630 635 640

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn
 645 650 655

Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr
 660 665 670

Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 675 680 685

92

Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr
690 695 700

Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln
705 710 715 720

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
725 730 735

Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe
740 745 750

Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr
755 760 765

Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
770 775 780

<210> 160
<211> 84
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 160

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His
1 5 10 15

Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His
35 40 45

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

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 161
<211> 84

93

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 161

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His
 1 5 10 15

Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 162
 <211> 183
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 162

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

Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80

94

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala
85 90 95

Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile
100 105 110

Thr Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr
115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp
130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro
165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
180

<210> 163

<211> 685

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 163

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

Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
85 90 95

95

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr
 100 105 110

Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe
 115 120 125

Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val
 130 135 140

Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 145 150 155 160

Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
 165 170 175

Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys
 180 185 190

Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
 195 200 205

Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met
 210 215 220

Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu
 225 230 235 240

His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu
 260 265 270

Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu
 275 280 285

Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met
 290 295 300

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320

Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala
 325 330 335

96

Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 340 345 350

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn
 355 360 365

Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu
 370 375 380

Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro
 385 390 395 400

Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val
 405 410 415

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu
 420 425 430

Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu
 435 440 445

Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu
 450 455 460

Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro
 465 470 475 480

Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr
 485 490 495

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr
 500 505 510

Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala
 515 520 525

Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp
 530 535 540

Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
 545 550 555 560

Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys
 565 570 575

97

Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
580 585 590

Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
595 600 605

Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile
610 615 620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
625 630 635 640

Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu
645 650 655

Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu
660 665 670

Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
675 680 685

<210> 164

<211> 782

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 164

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

Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala
85 90 95

98

Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile
 100 105 110

Thr Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr
 115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp
 130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
 145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro
 165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 180 185 190

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg
 195 200 205

Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala
 210 215 220

Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu
 225 230 235 240

Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 245 250 255

Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 260 265 270

Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys
 275 280 285

Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 290 295 300

Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala
 305 310 315 320

Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr
 325 330 335

99

Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 340 345 350

Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala
 355 360 365

Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys
 370 375 380

Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser
 385 390 395 400

Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 405 410 415

Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu
 420 425 430

Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 435 440 445

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460

Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro
 465 470 475 480

Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met
 485 490 495

Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu
 500 505 510

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

Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu
 530 535 540

Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 545 550 555 560

Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln
 565 570 575

100

Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu
 580 585 590

Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg
 595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala
 610 615 620

Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu
 625 630 635 640

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn
 645 650 655

Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr
 660 665 670

Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 675 680 685

Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr
 690 695 700

Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln
 705 710 715 720

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 725 730 735

Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe
 740 745 750

Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr
 755 760 765

Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 770 775 780

<210> 165

<211> 86

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

101

<400> 165

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

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

Glu Thr Phe Thr Thr Thr
 85

<210> 166

<211> 784

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 166

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

Trp Ser Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu Leu Thr
 20 25 30

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

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

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp
 85 90 95

102

Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu
 100 105 110

Ile Thr Trp Ser Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu
 115 120 125

Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp
 130 135 140

Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp
 145 150 155 160

Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser
 165 170 175

Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
 195 200 205

His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
 210 215 220

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala
 225 230 235 240

Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 245 250 255

Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 260 265 270

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala
 275 280 285

Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 290 295 300

His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly
 325 330 335

103

His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 340 345 350

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys
 355 360 365

Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly
 370 375 380

Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys
 385 390 395 400

Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr
 420 425 430

Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 450 455 460

Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp
 485 490 495

Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
 500 505 510

Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser
 530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 545 550 555 560

Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu
 565 570 575

104

Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
 580 585 590

Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu
 595 600 605

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 610 615 620

Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu
 625 630 635 640

Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile
 645 650 655

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His
 660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
 690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
 705 710 715 720

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe
 755 760 765

Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 770 775 780

<210> 167

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

105

<400> 167

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala
 35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 168

<211> 83

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Ser or Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa представляет собой любой из His, Ile, Val, Phe or Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa представляет собой любой из Ala, Gly, Glu or Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa представляет собой любой из Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn

106

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa представляет собой любой из Phe or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa представляет собой любой из Ile, Val, His, Glu or Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa представляет собой любой из Gly, Trp or Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> Xaa представляет собой любой из Trp, Phe or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Gln, Met or His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> Xaa is any Trp or His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(69)
<223> Xaa представляет собой любой из Arg or Ser

<400> 168

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa
1          5          10          15

Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
          20          25          30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Xaa His Xaa Ala
          35          40          45

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

Leu Ile Cys Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65          70          75          80

Phe Thr Thr

```


107

<210> 169
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой любой из Ser or Leu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа представляет собой любой из Asp or Glu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой любой из His, Ile, Val, Phe or Trp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой любой из Ala, Gly, Glu or Asp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой любой из Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой любой из Phe or Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа представляет собой любой из Ile, Val, His, Glu or Asp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой любой из Gly, Trp or Val

 <400> 169

 Хаа Asp Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

 <210> 170
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

108

```

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa представляет собой любой из Trp, Phe or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Gln, Met or His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa представляет собой любой из Trp or His

<400> 170

Trp Xaa His Xaa Ala Xaa
1          5

<210> 171
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is Arg or Ser

<400> 171

Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala
1          5          10

<210> 172
<211> 87
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Lys or Glu

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa is Thr or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa is Asn or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Leu, Ala, Phe и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Xaa представляет собой любой из Tyr, Ala, Gly, Val, Ile и Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa представляет собой любой из Tyr, Ser, Ala и His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa представляет собой любой из Asn, Asp, His и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa представляет собой любой из Leu, Phe, His и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa представляет собой любой из His, Pro, Ser, Leu и Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa представляет собой любой из Gly, Phe, His и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa is Ala or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Asn, Glu, Arg и Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Gln, Thr, Asn и Ala

<220>

110

<221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa is absent or представляет собой любой из Pro, Val, Ile и Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa is absent or is Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa is Glu or Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa представляет собой любой из

<400> 172

Ile Glu Val Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa
 1 5 10 15

Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly
 20 25 30

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

Xaa Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa Tyr
 50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 173
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is Ala or Thr

<400> 173

111

Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly Ile
1 5

<210> 174
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is Lys or Glu

<400> 174

Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr
1 5

<210> 175
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is Thr or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is Asn or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Leu, Ala, Phe и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa представляет собой любой из Tyr, Ala, Gly, Val, Ile и Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa представляет собой любой из Tyr, Ser, Ala и His

<220>
<221> MISC_FEATURE

112

```

<222> (8)..(8)
<223> Xaa представляет собой любой из Asn, Asp, His и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa представляет собой любой из Leu, Phe, His и Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa представляет собой любой из His, Pro, Ser, Leu и Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa представляет собой любой из Gly, Phe, His и Tyr

<400> 175

Xaa Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 176
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Asn, Glu, Arg и Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa представляет собой любой из Ser, Gln, Thr, Asn и Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is not present or представляет собой любой из Pro, Val, Ile и
Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is not present or is Ile

<400> 176

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Val His
1          5

```

113

<210> 177
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..()
 <223> Xaa is Glu or Lys

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <400> 177
 Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa
 1 5

<210> 178
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is Ser or Asn

 <400> 178
 Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro Ala
 1 5 10

<210> 179
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

 <220>

114

```

<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из G, A, T, и C

<400> 179
accgcgctga ttacctggnh tnhtscgnht gsnhtnhtn htggctgtga actgacctat
60

ggcattaataa
69

<210> 180
<211> 75
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

```



```

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<400> 180
accgcgctga ttacctggnh tnhtbstnht nhtnhtnhtn htnhtnhtgg ctgtgaactg
60

acctatggca ttaaa
75

<210> 181
<211> 78
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
<221> misc_feature

```

116

```

<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<400> 181
accgcgctga ttacctggnh tvmaccgght nhtnhtrrcr gcnhtvttnh tggctgtgaa
60

ctgacctatg gcattaaa
78

<210> 182
<211> 64
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

```

117

<400> 182
 cgatcgacc accatagatc tgnhtnhtnh tnhtnhtnht tatagcattg gtaacctgaa
 60

accg
 64

<210> 183
 <211> 73
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 <223> N представляет собой любой из A, G, T и C

<400> 183
 gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtg htnhtnhtkc gaaagaaacc
 60

tttaccaccg gtg
 73

<210> 184
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

118

```

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<400> 184
gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtnhtn htrgcnhtcc ggcgaaagaa
60

acctttacca ccggtg
76

<210> 185
<211> 79
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из A, G, Т и С

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой любой из А, G, Т и С

<400> 185
gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtn htnhtagcaa cccggcgaaa
60

gaaaccttta ccaccggtg
79

<210> 186
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 186
cagatctatg gtggtgcgat cgcccggcac atctttaatg ccatagggtca gttcaca
57

<210> 187
<211> 53
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 187
gcaaatcagg ctcaattcat attcgggtatc cggtttcagg ttaccaatgc tat
53

<210> 188
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 188

```

120

cggggtcgggtt ggggtaccgc caccggtggt aaaggtttct tt
42

<210> 189
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 189
cggggtcgggtt ggggta
16

<210> 190
<211> 67
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 190
ggcccagccg gccatggccg ccattgaagt gaaagatgtg accgatacca ccgcgctgat
60

tacctgg
67

<210> 191
<211> 73
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> NNN encodes for Ala or Pro

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> NNN encodes for Ala or Gly

121

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 191
accgcgctga ttacctgggc tnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnggctgtga actgacctat
60

ggcattaaag atg
73

<210> 192
<211> 69
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> each N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> each N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> each N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> each N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(38)
<223> each N представляет собой любой из А, G, Т и С

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(41)

```

122

<223> each N представляет собой любой из A, G, T и C

<400> 192

accgcgctga ttacctgggn knnksmggnk gstnnknnkn nkggctgtga actgacctat
60

ggcattaaa

69

<210> 193

<211> 69

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> each N представляет собой любой из A, T, C or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(26)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(29)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<220>

123

```

<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> each N представляет собой любой из G, A, C и T

<400> 193
accgcgctga ttacctggnn knnknnknknk nnknnknhtn nknkktgtga actgacctat
60

ggcattaata
69

<210> 194
<211> 76
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(49)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(51)
<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 194
gatgtgcccgcg gcgatcgcac caccatagat ctgnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn ntatagcatt
60

ggtaacctga aaccgg
76

<210> 195

```

124

<211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 195
 ccaggtaatc agcgcggtgg tat
 23

<210> 196
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 196
 cagatctatg gtggtgcgat cgc
 23

<210> 197
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<400> 197
 tgtgaactga cctatggcat taaagatgt
 29

<210> 198
 <211> 75
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая конструкция

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)

125

```

<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<400> 198
accgcgctga ttacctggnh tnhtvntnht nhtnhtnhtn htnhtnhtgg ctgtgaactg
60

acctatggca ttaaa
75

<210> 199
<211> 75
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<220>

```

126

```

<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> N представляет собой любой из G, A, T и C

<400> 199
accgcgctga ttacctgggnh tnhtvntnht nhtnhtnhtn htnhtnhtnh ttgtgaactg
60

acctatggca ttaaa
75

```

127

<210> 200
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 200
 ggcccagccg gccatggccg ccattgaagt ggaagatgtg accgatacca ccgcgctgat
 60

 tacctgg
 67

 <210> 201
 <211> 585
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая конструкция

 <400> 201
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

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

 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

128

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

129

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Asn His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Leu Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 202

<211> 683

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

130

<400> 202

Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn
 35 40 45
 Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
 130 135 140
 Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 165 170 175
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 180 185 190
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240

132

132

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
485 490 495

Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
500 505 510

Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu
		515					520					525			

Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
545 550 555 560

Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680

<210> 203

<211> 683

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

133

<400> 203

Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn
 35 40 45
 Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
 130 135 140
 Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 165 170 175
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 180 185 190
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240

134

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 260 265 270

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
 290 295 300

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 305 310 315 320

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
 325 330 335

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
 340 345 350

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
 355 360 365

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
 370 375 380

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 385 390 395 400

Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 405 410 415

Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 420 425 430

Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 435 440 445

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 450 455 460

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 465 470 475 480

136

<400> 204

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

Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala
20 25 30

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

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

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
65 70 75 80

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu
100 105 110

Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg
115 120 125

Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys
130 135 140

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro Tyr Val
145 150 155 160

His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser
165 170 175

Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala Lys Glu
180 185 190

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala
195 200 205

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
210 215 220

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser
225 230 235 240

Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	245	250	255
Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	260	265	270
His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	275	280	285
Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	290	295	300
Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	305	310	315
Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	325	330	335
Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	340	345	350
Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	355	360	365
Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	370	375	380
Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	385	390	395
Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	405	410	415
Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	420	425	430
Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	435	440	445
Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	450	455	460
Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	465	470	475

138

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
 485 490 495

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
 500 505 510

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 515 520 525

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 530 535 540

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 545 550 555 560

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 565 570 575

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 580 585 590

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 595 600 605

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 610 615 620

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 625 630 635 640

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 645 650 655

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 660 665 670

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 675 680 685

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 690 695 700

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 705 710 715 720

Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg
115 120 125

140

Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys
 130 135 140

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro Tyr Val
 145 150 155 160

His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser
 165 170 175

Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala Lys Glu
 180 185 190

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala
 195 200 205

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
 210 215 220

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser
 225 230 235 240

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
 245 250 255

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu
 260 265 270

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu
 275 280 285

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg
 290 295 300

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
 305 310 315 320

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn
 325 330 335

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His
 340 345 350

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys
 355 360 365

141

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu
 370 375 380

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala
 385 390 395 400

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala
 405 410 415

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala
 420 425 430

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His
 435 440 445

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala
 450 455 460

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
 465 470 475 480

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile
 485 490 495

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala
 500 505 510

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 515 520 525

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 530 535 540

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 545 550 555 560

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 565 570 575

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 580 585 590

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 595 600 605

142

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
610 615 620

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
625 630 635 640

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
645 650 655

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
660 665 670

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
675 680 685

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
690 695 700

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
705 710 715 720

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
725 730 735

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
740 745 750

Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
755 760 765

Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
770 775 780

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
785 790

<210> 206

<211> 190

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 206

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

143

Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

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

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
 100 105 110

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Glu Phe Gly His
 115 120 125

Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
 130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr
 165 170 175

Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 180 185 190

<210> 207

<211> 680

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 207

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

Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

144

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His
 35 40 45
 Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60
 Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 85 90 95
 Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
 100 105 110
 Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
 115 120 125
 Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
 130 135 140
 Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
 145 150 155 160
 Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
 165 170 175
 Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
 180 185 190
 Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
 195 200 205
 Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 210 215 220
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 225 230 235 240
 His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 245 250 255
 Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 260 265 270

145

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
 275 280 285

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
 290 295 300

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
 305 310 315 320

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
 325 330 335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
 340 345 350

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
 370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
 385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
 405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
 420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
 435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
 450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
 465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
 485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
 500 505 510

146

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
545 550 555 560

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
565 570 575

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
595 600 605

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
610 615 620

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
625 630 635 640

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
645 650 655

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
660 665 670

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680

<210> 208
<211> 785
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая конструкция

<400> 208

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

Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

147

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His
 35 40 45
 Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60
 Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
 100 105 110
 Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Glu Phe Gly His
 115 120 125
 Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
 130 135 140
 Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly
 145 150 155 160
 Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr
 165 170 175
 Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 195 200 205
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 210 215 220
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 245 250 255
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 260 265 270

148

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 275 280 285

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 290 295 300

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 305 310 315 320

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 325 330 335

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 340 345 350

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 355 360 365

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 370 375 380

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 500 505 510

149

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 610 615 620

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 625 630 635 640

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 645 650 655

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 705 710 715 720

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750

150

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 755 760 765

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 770 775 780

Leu
 785

<210> 209

<211> 190

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 209

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
 100 105 110

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu
 115 120 125

Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
 130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly
 145 150 155 160

151

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser
165 170 175

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
180 185 190

<210> 210

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

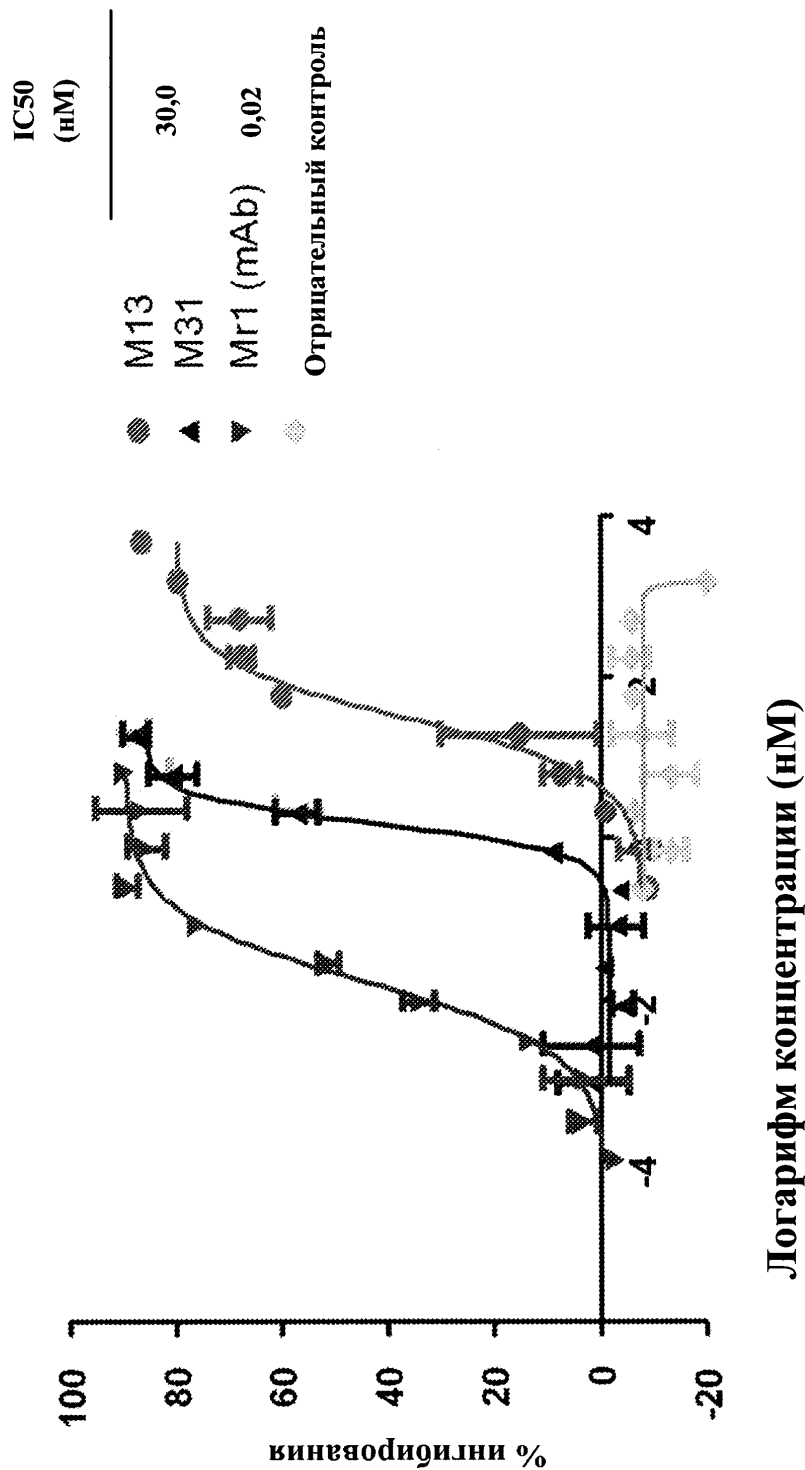
<220>

<223> синтетическая конструкция

<400> 210

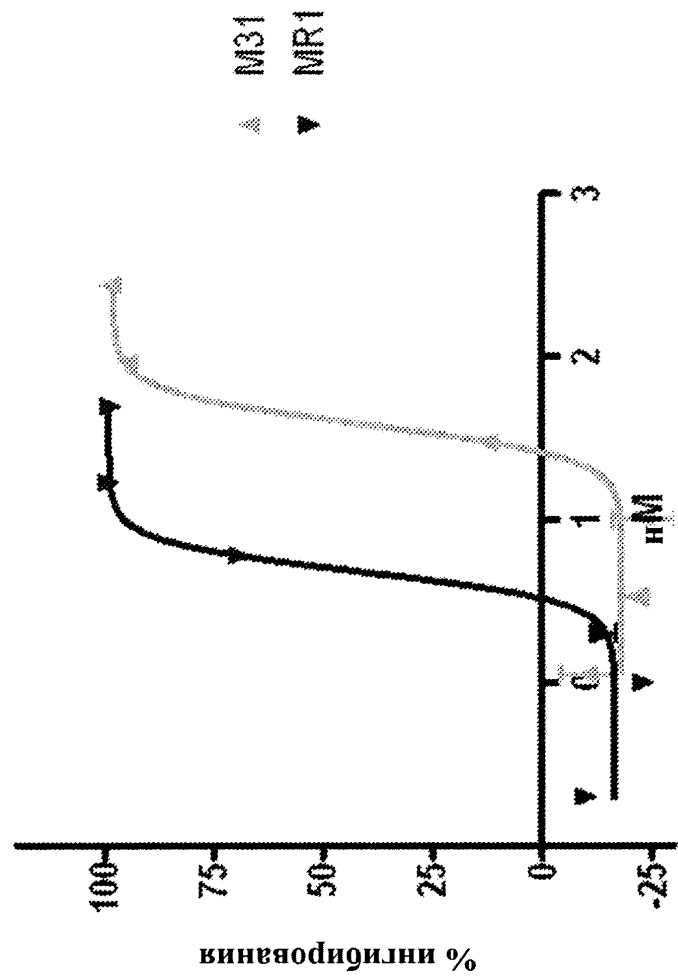
Met Thr Asn Ile Thr Lys Arg Ser Leu Val Ala Ala Gly Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Met Ala Gly Asn Val Ala Met Ala
20 25

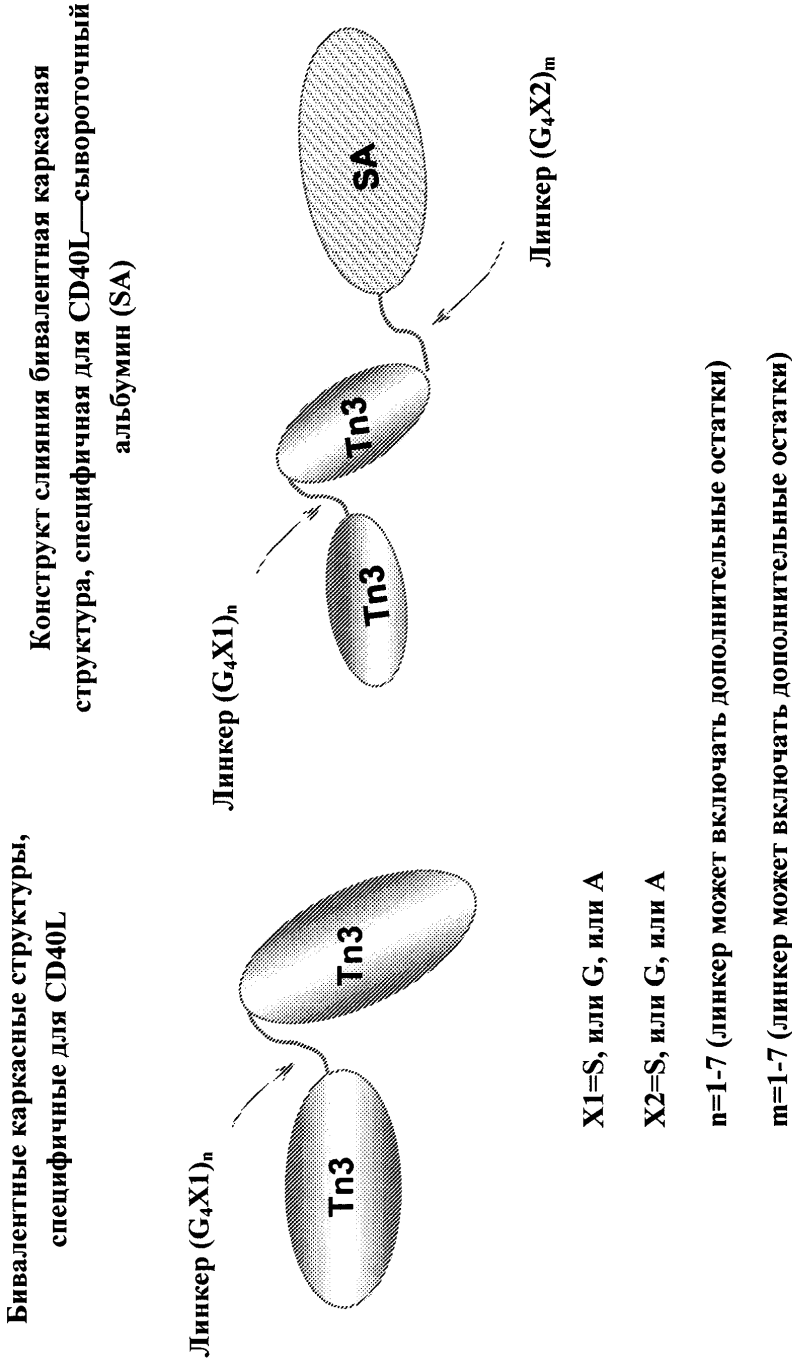


Фиг. 1А

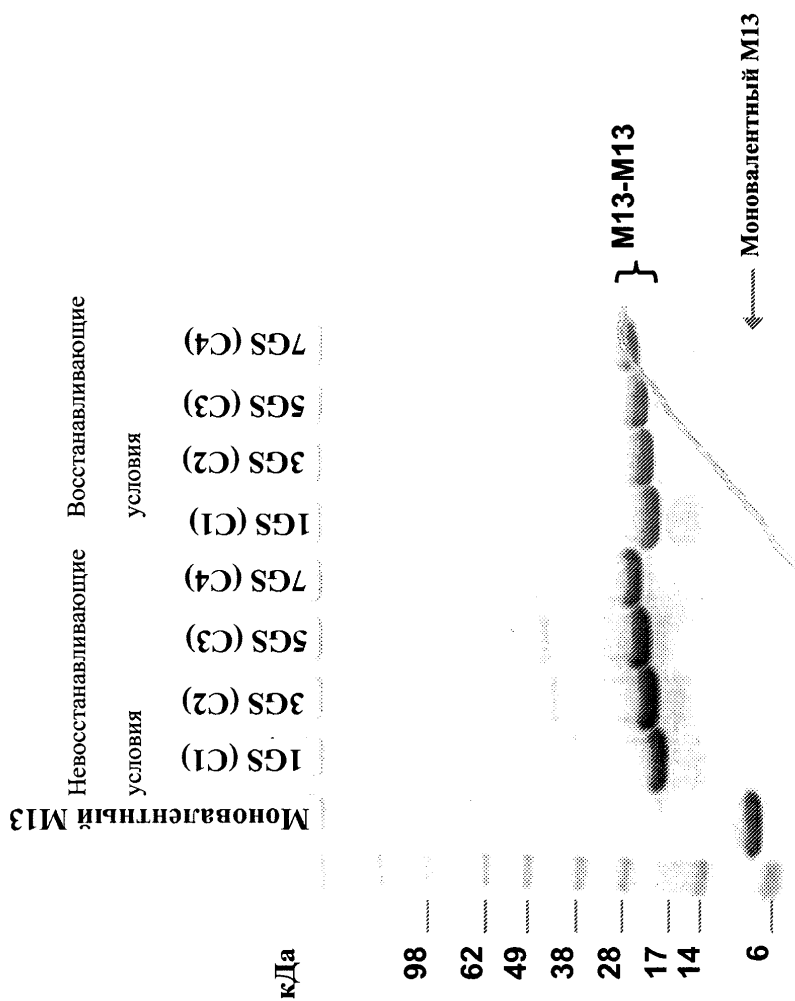
2/52



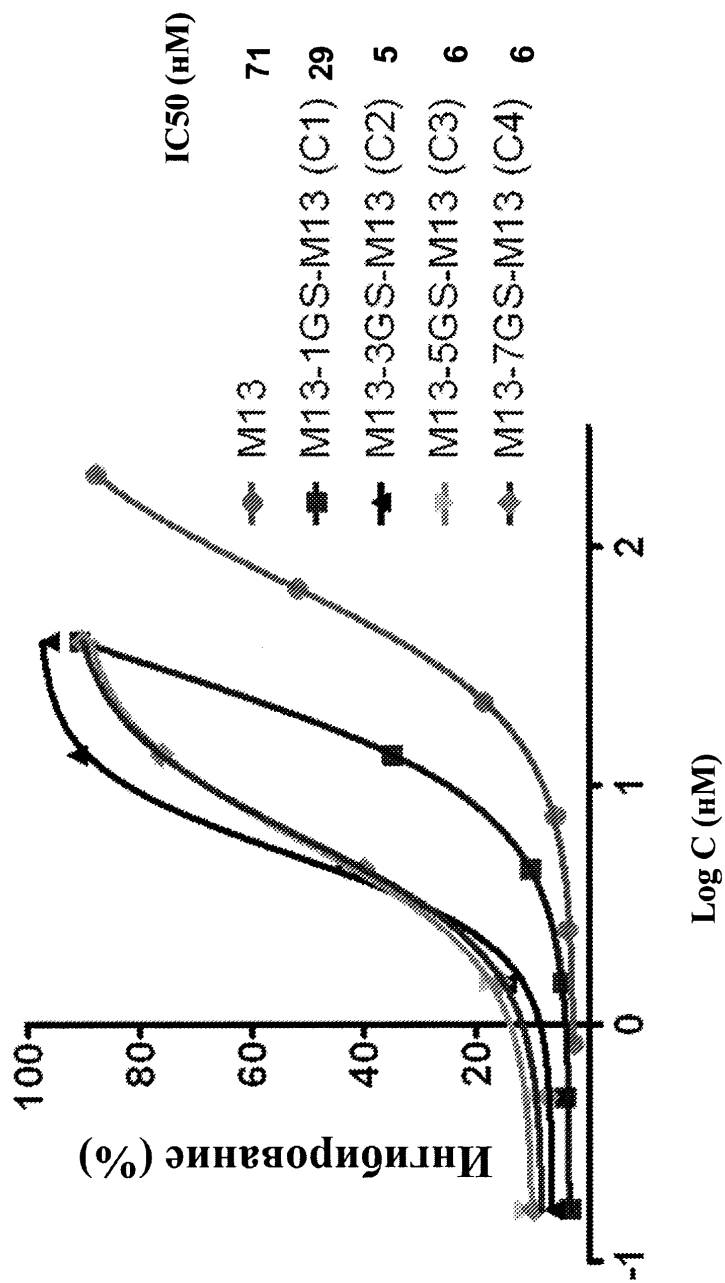
Фиг. 1В



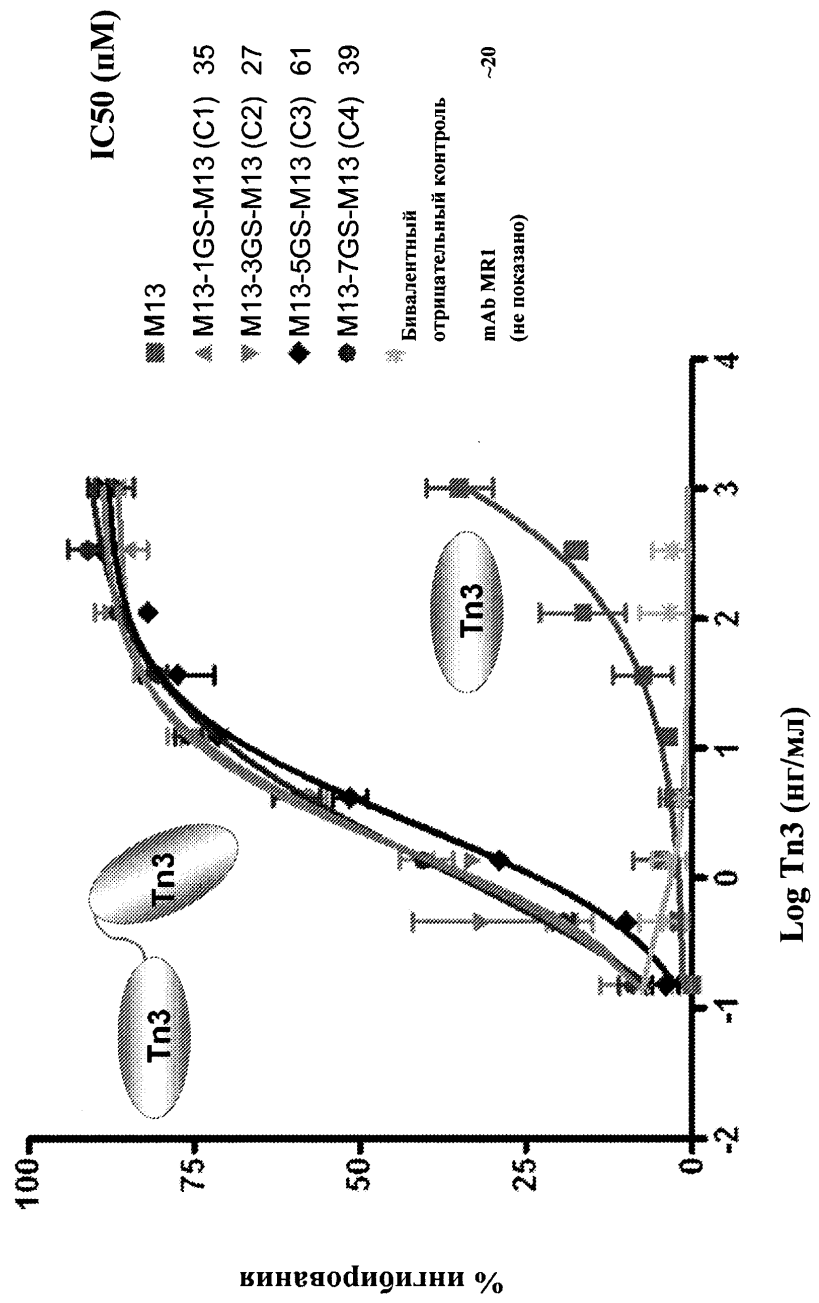
Фиг. 2А



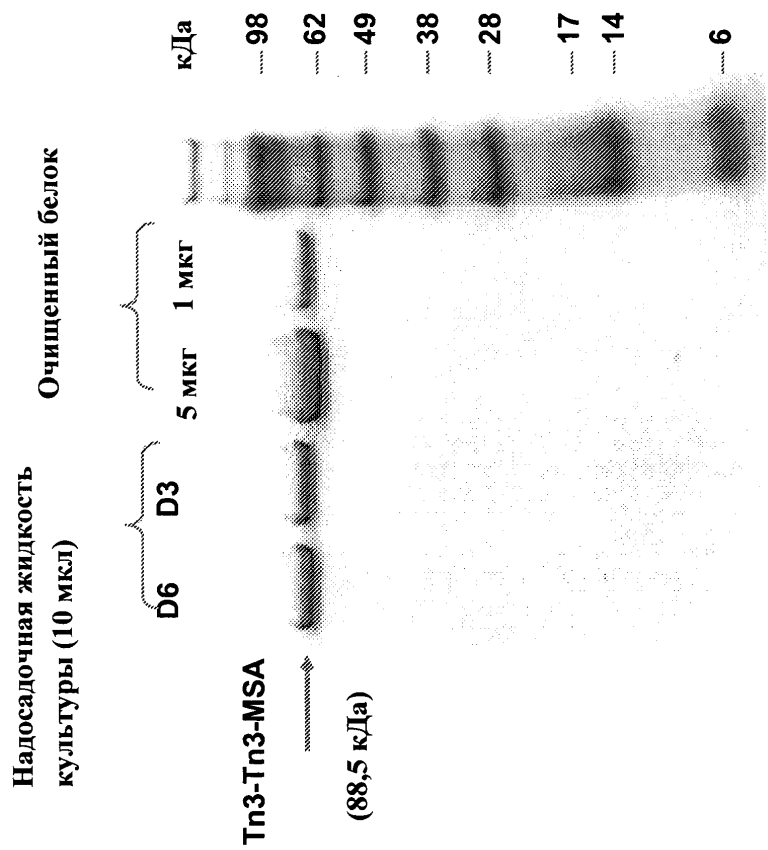
Фиг. 2В



Фиг. 2С

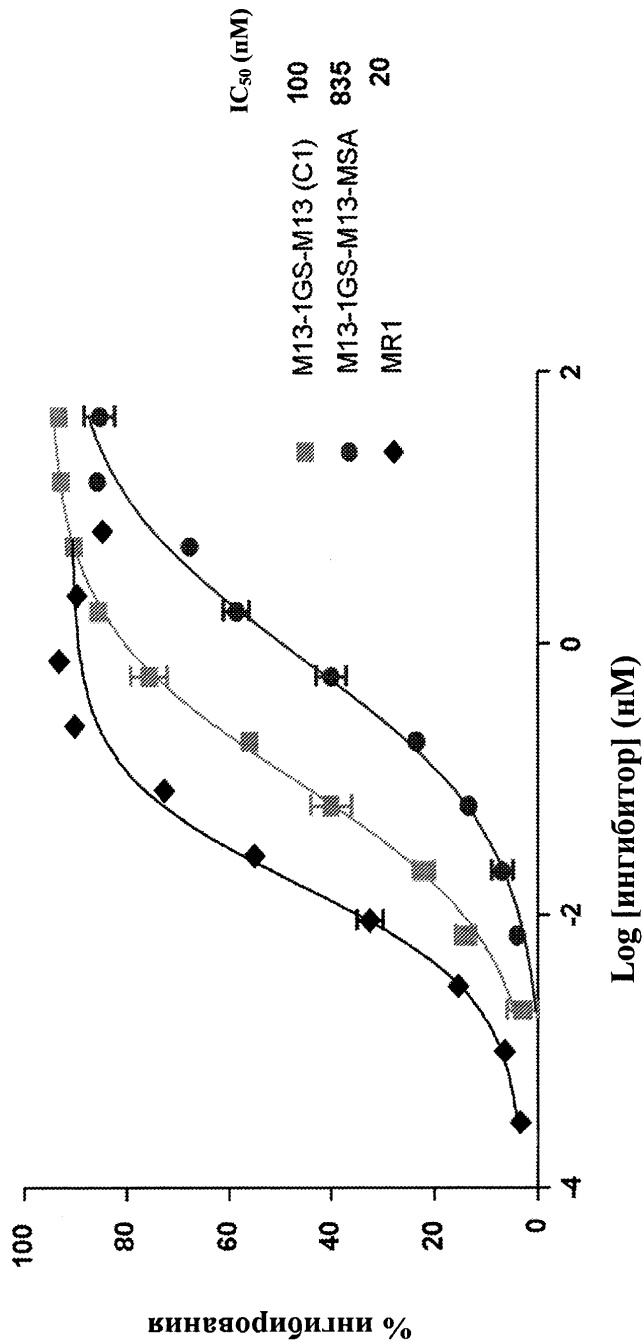


Фиг. 2D

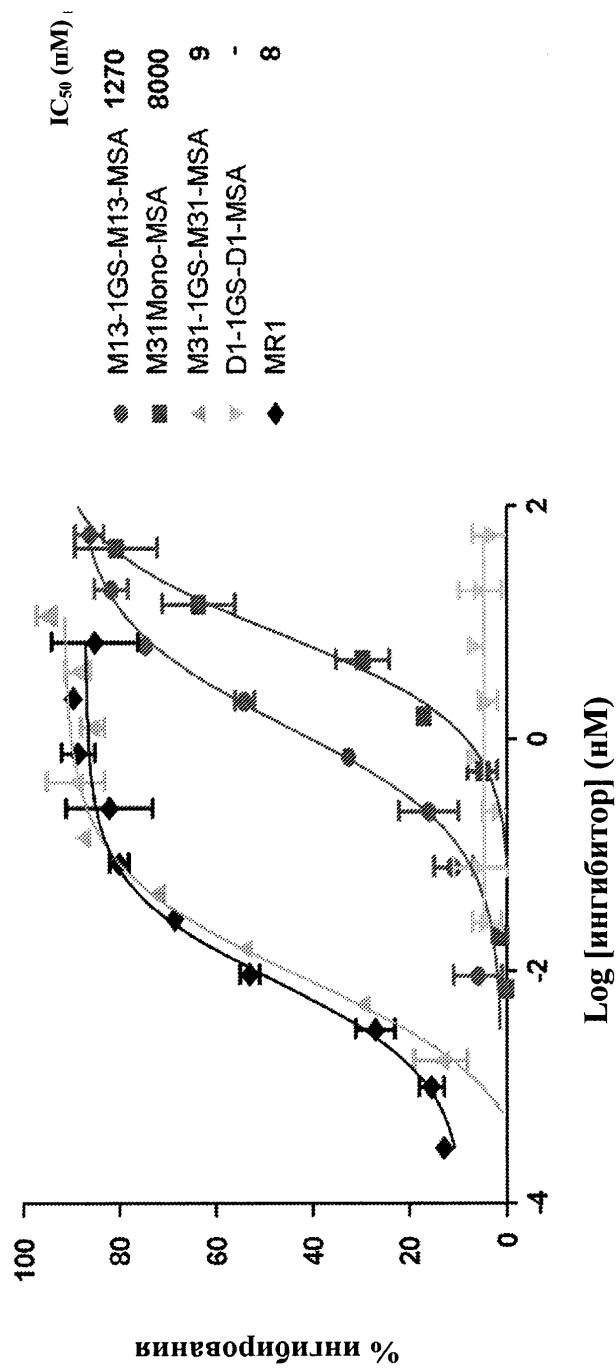


Фиг. 3А

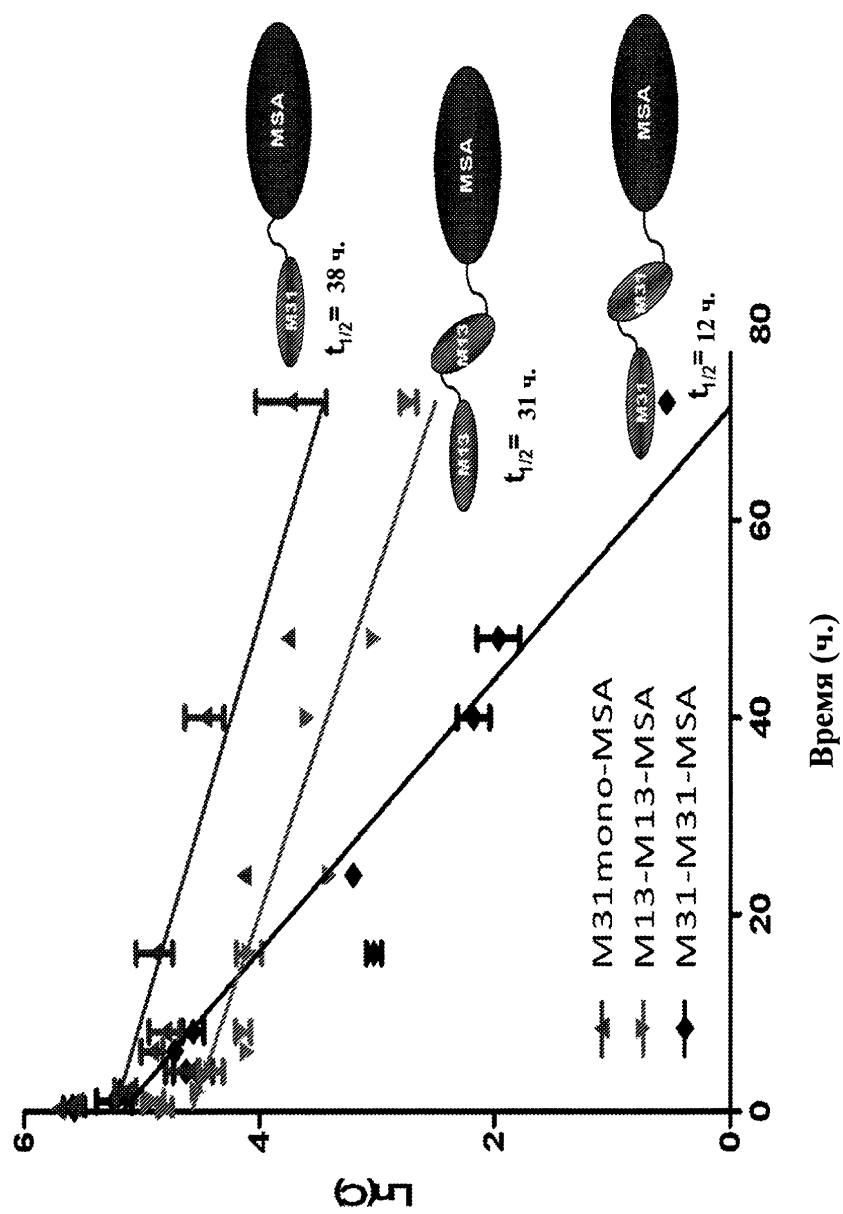
8/52



Фиг. 3В

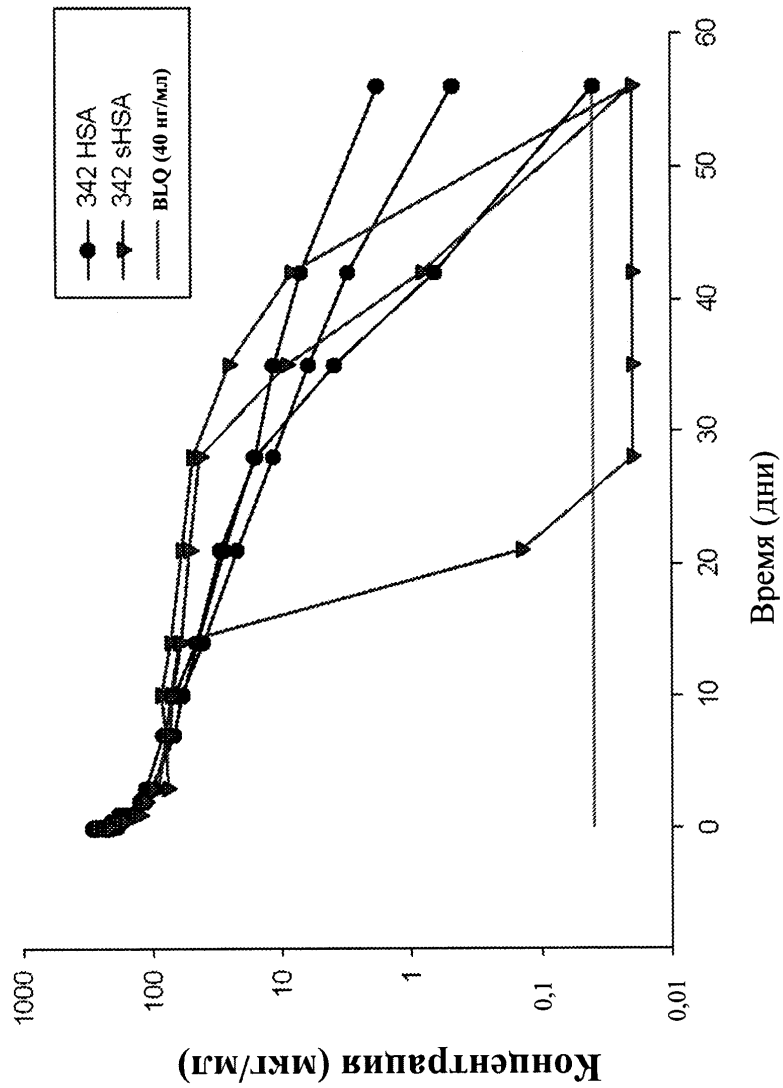


Фиг. 3С

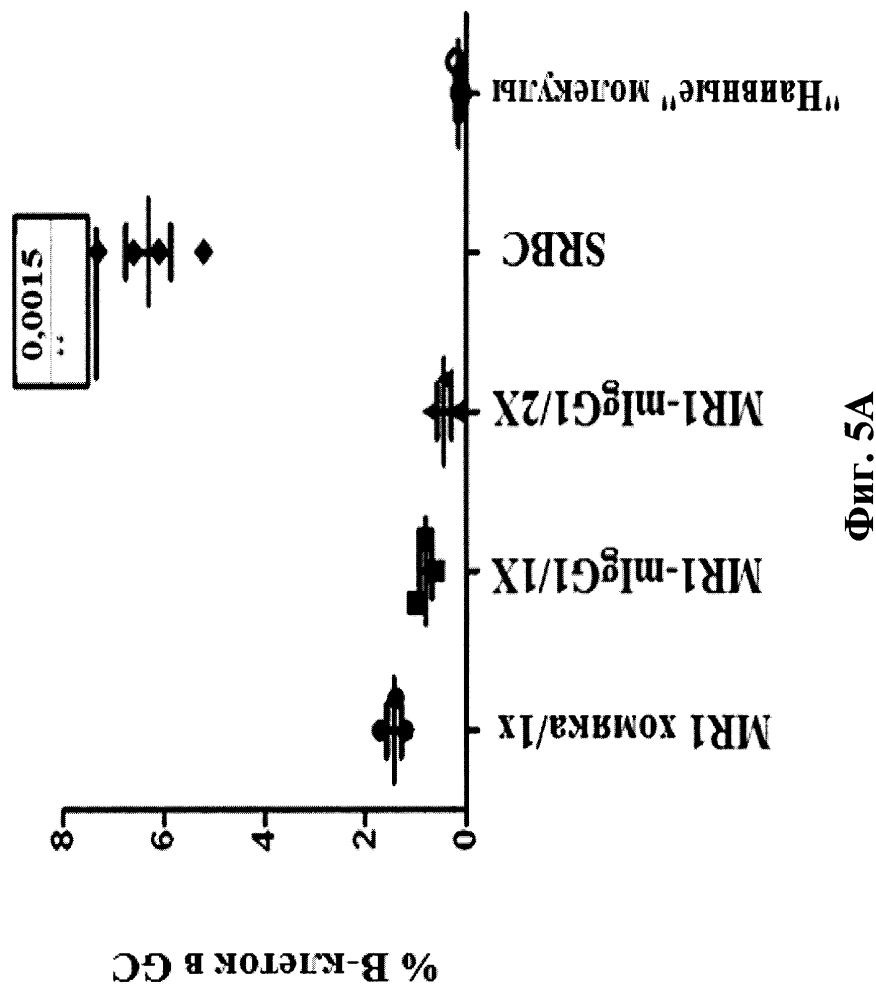


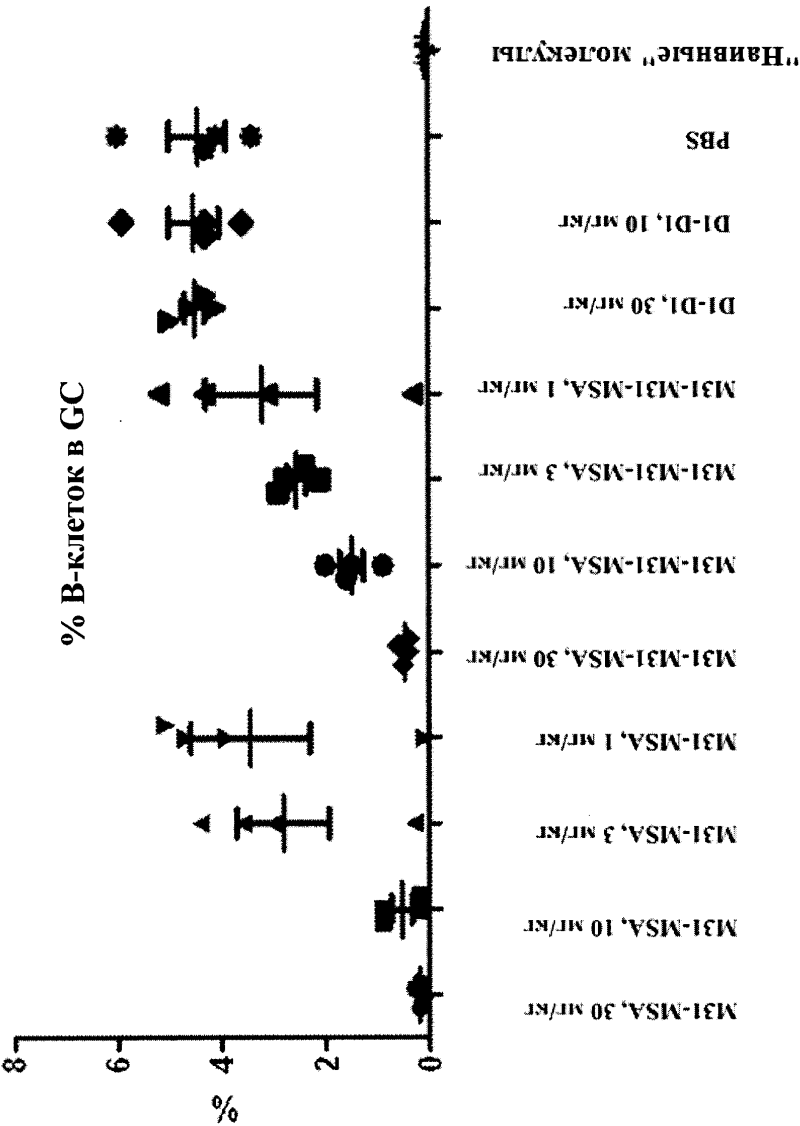
Фиг. 4А

11/52

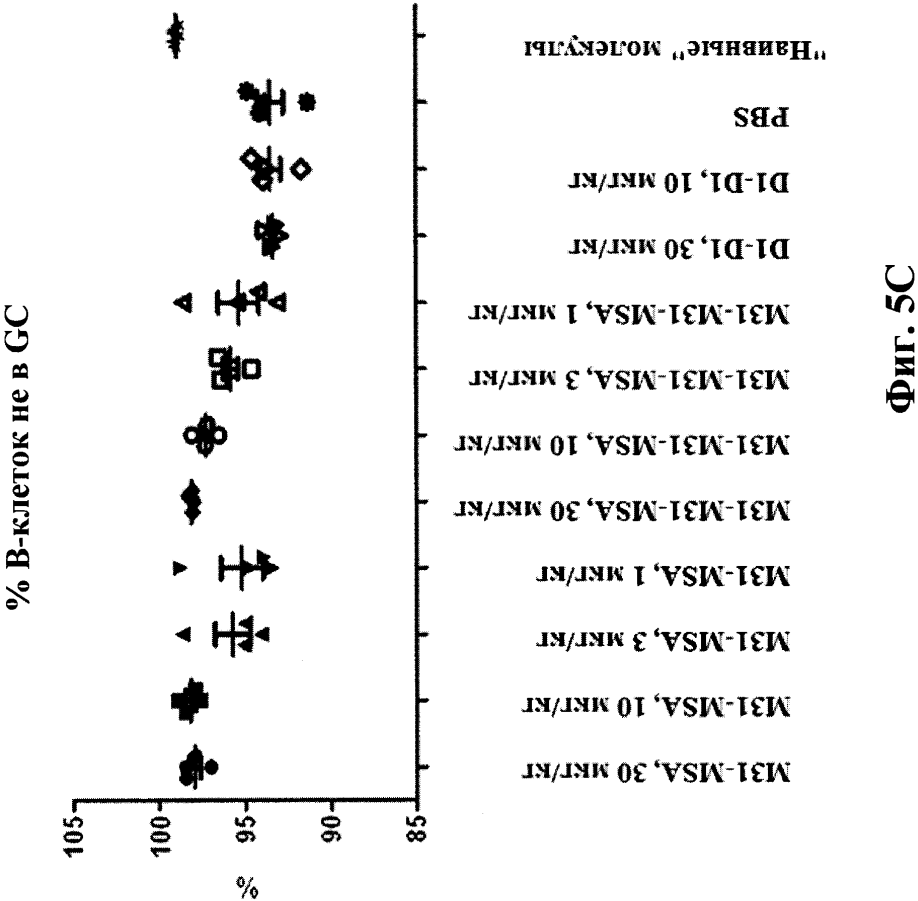


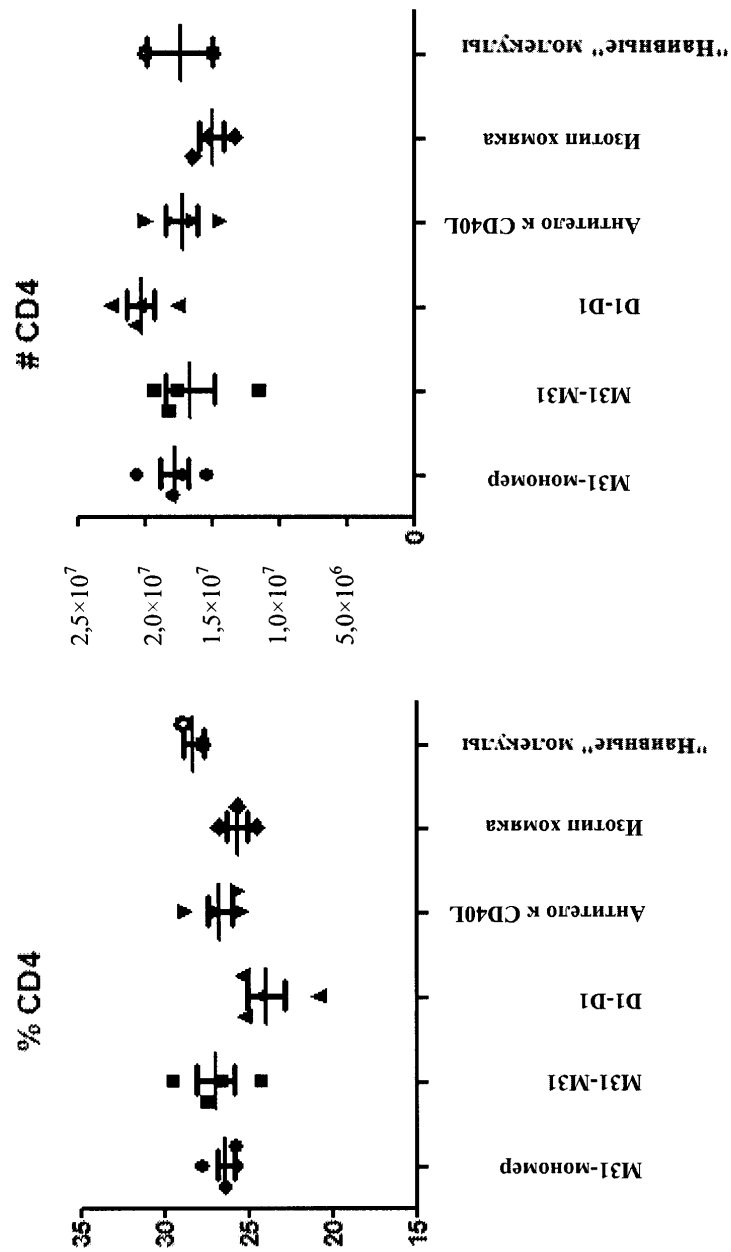
Фиг. 4В



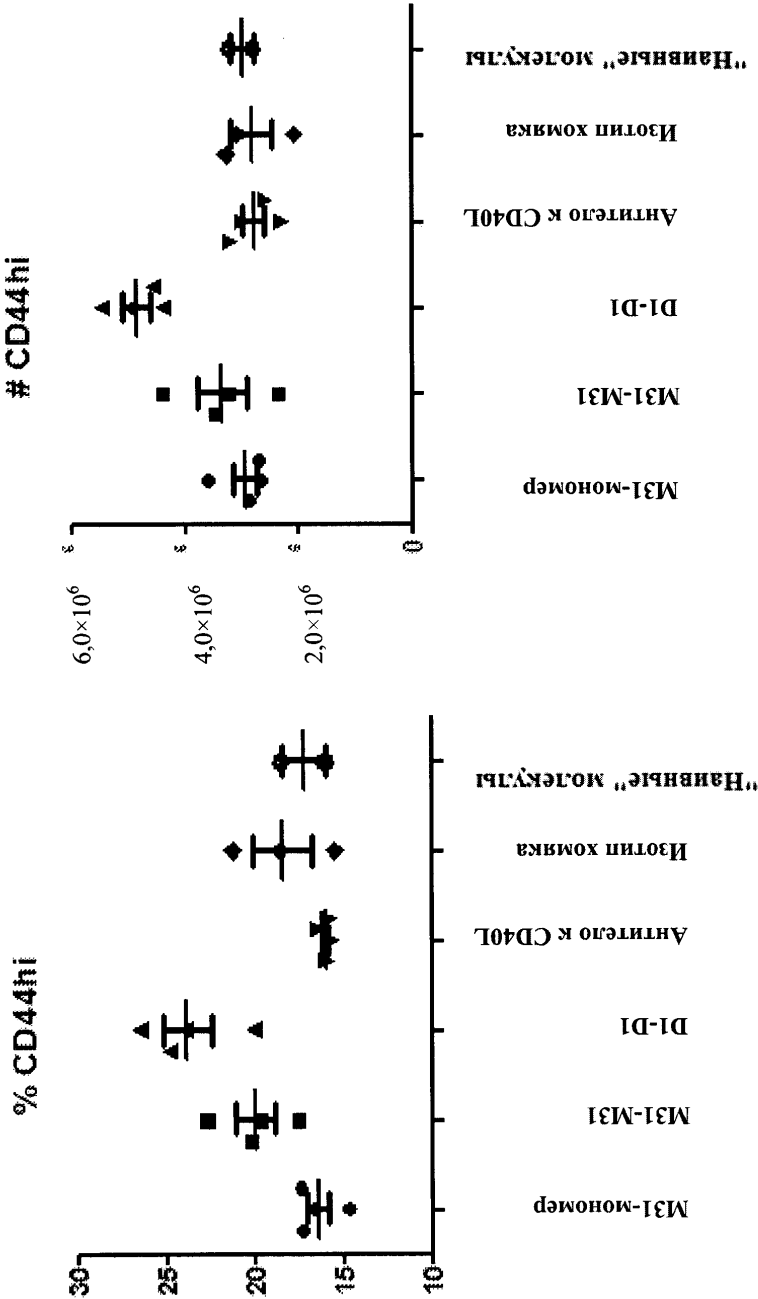


Фиг. 5В

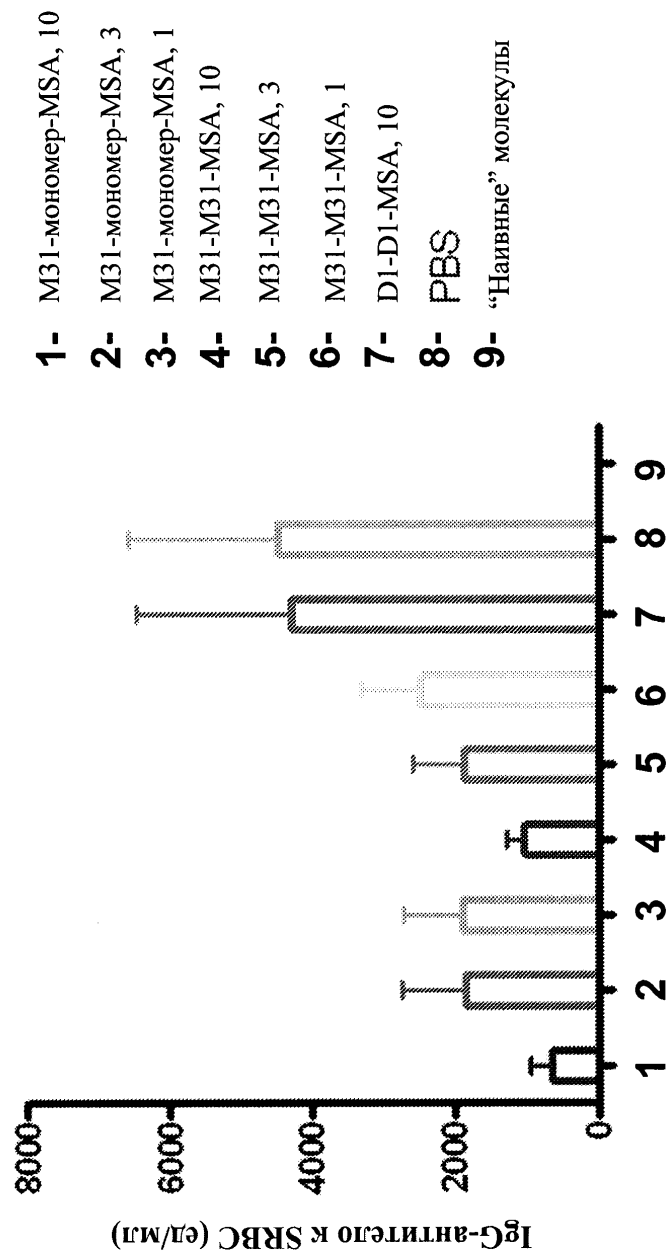




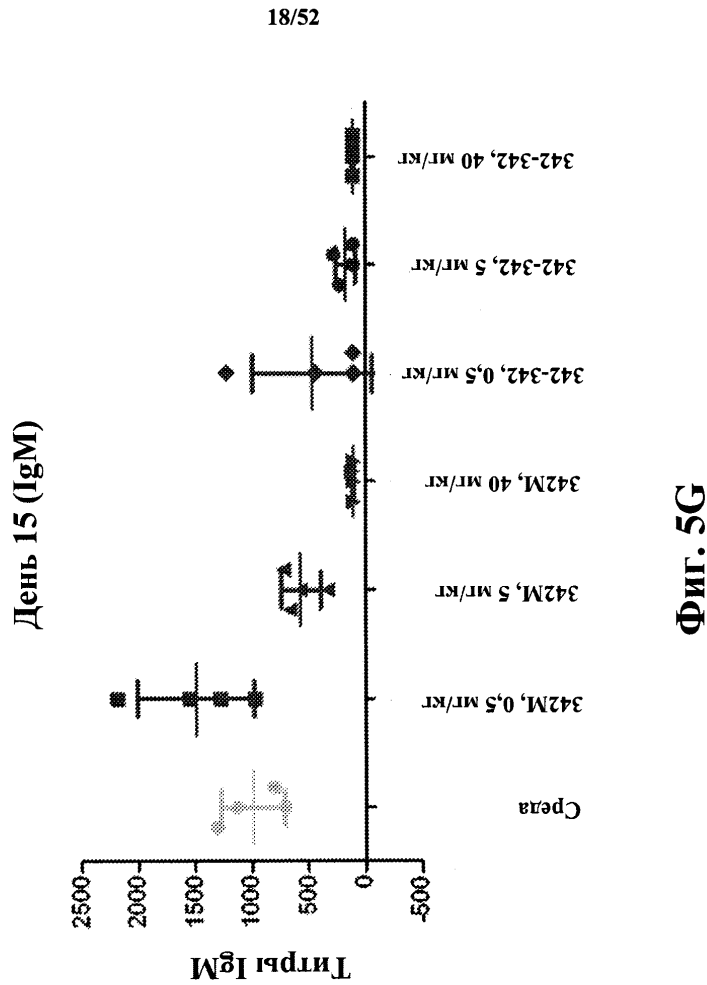
Фиг. 5D



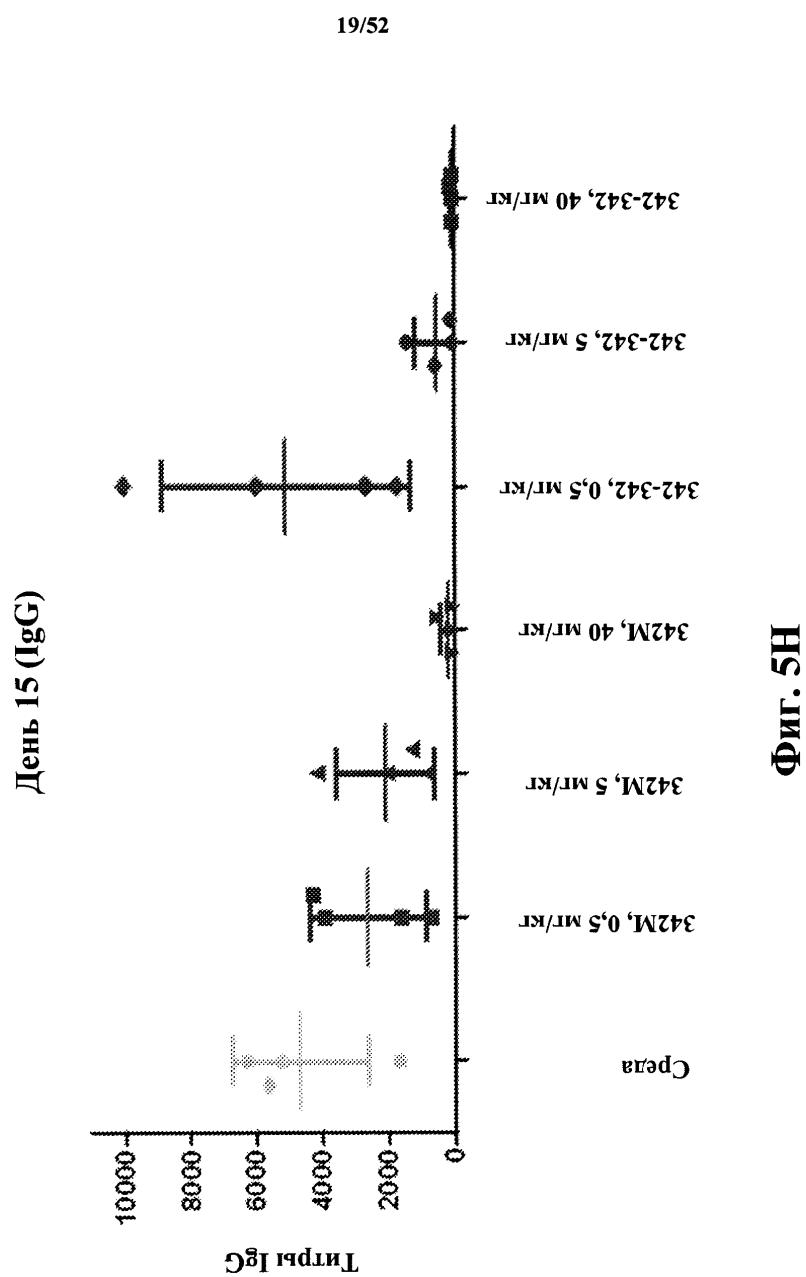
Фиг. 5Е



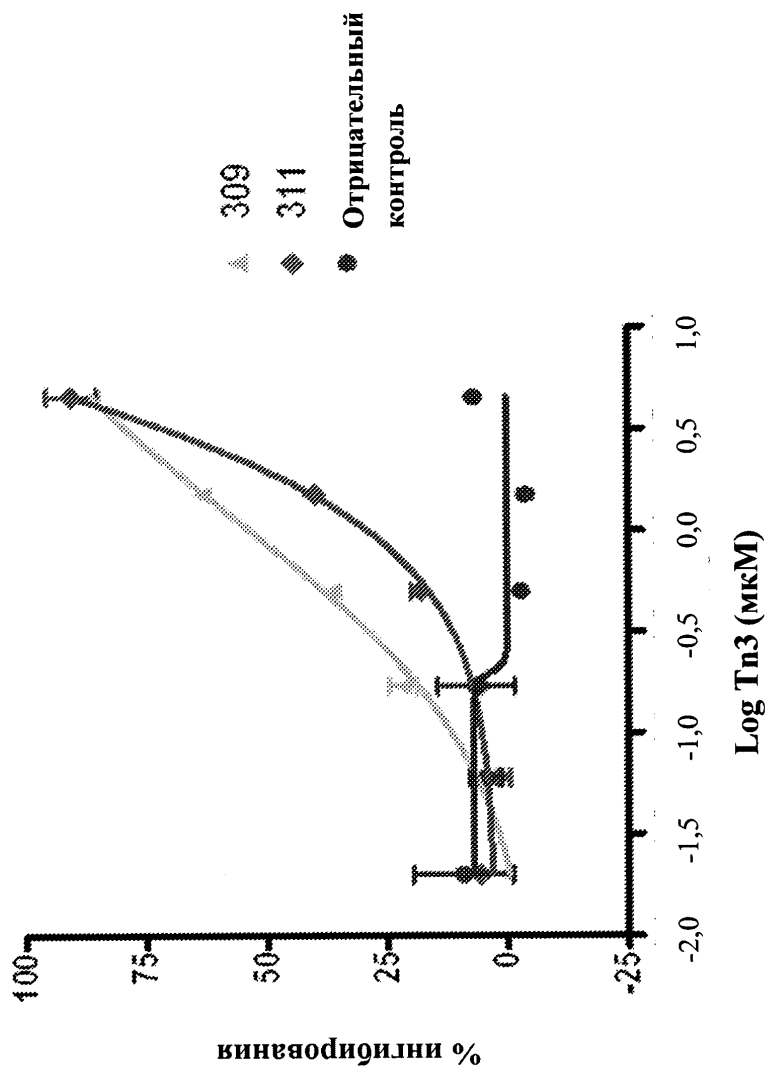
Фиг. 5F



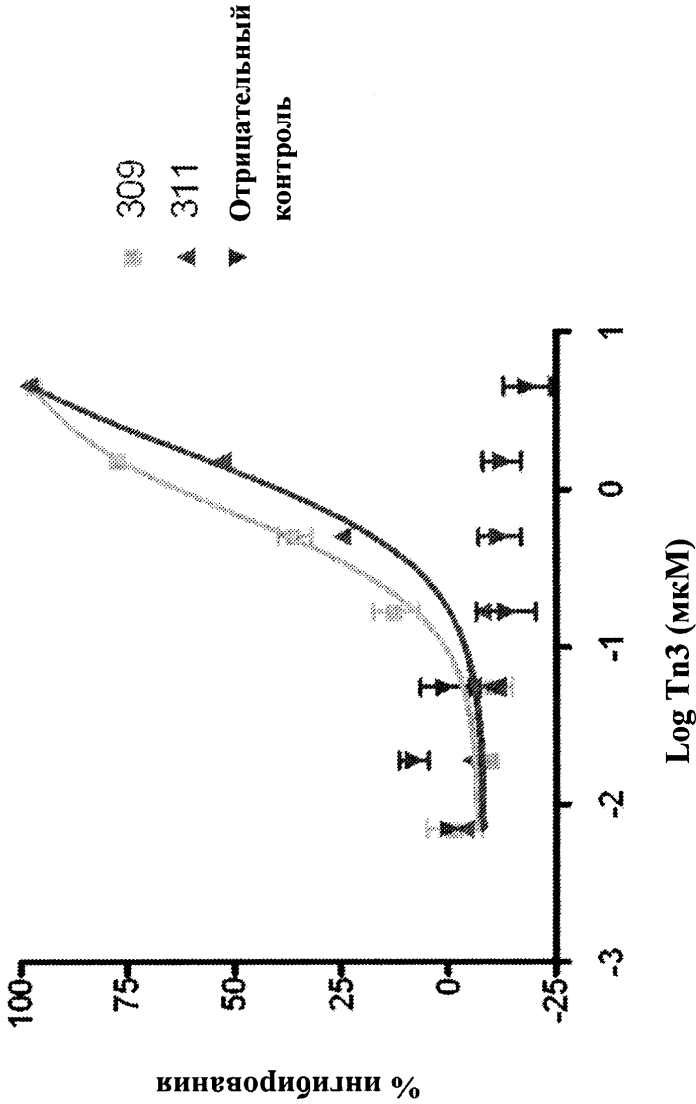
18/52



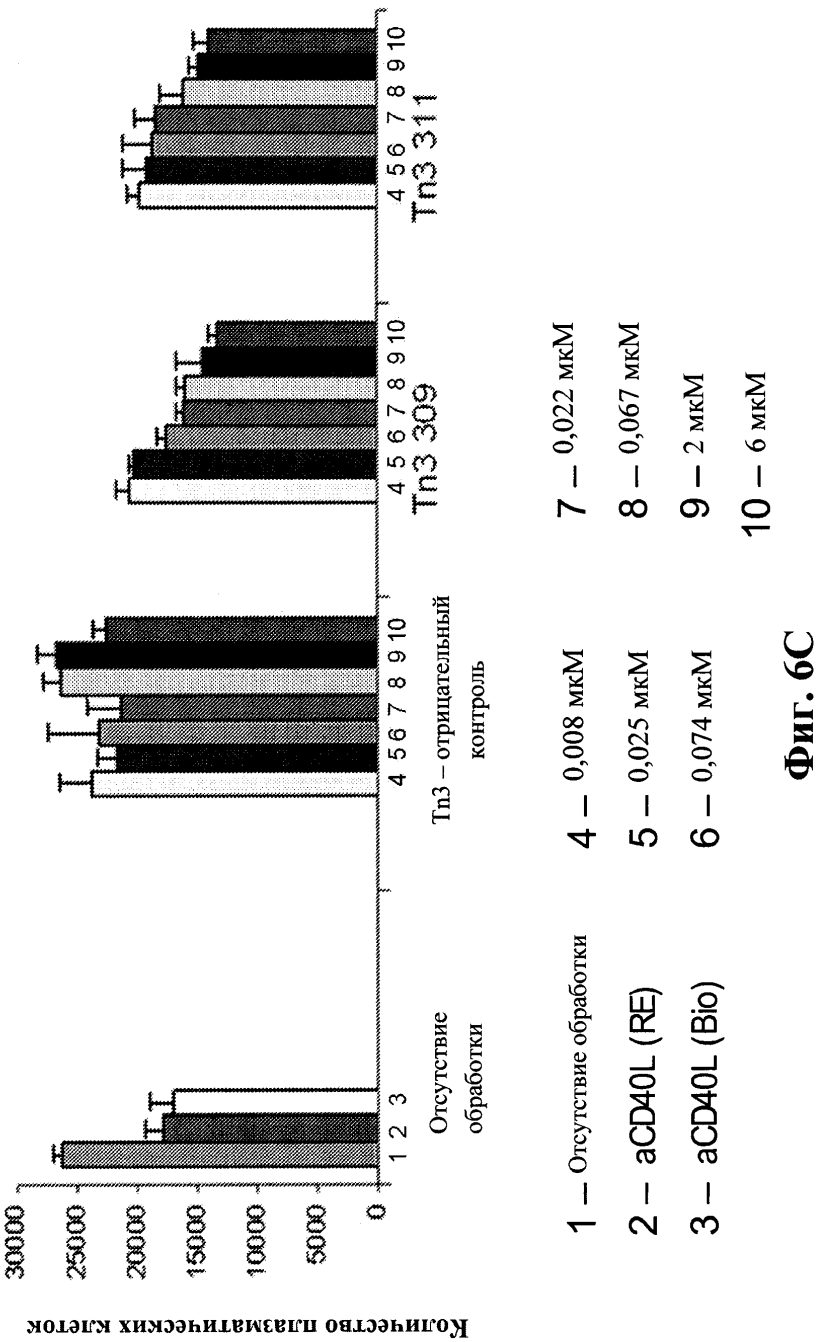
20/52



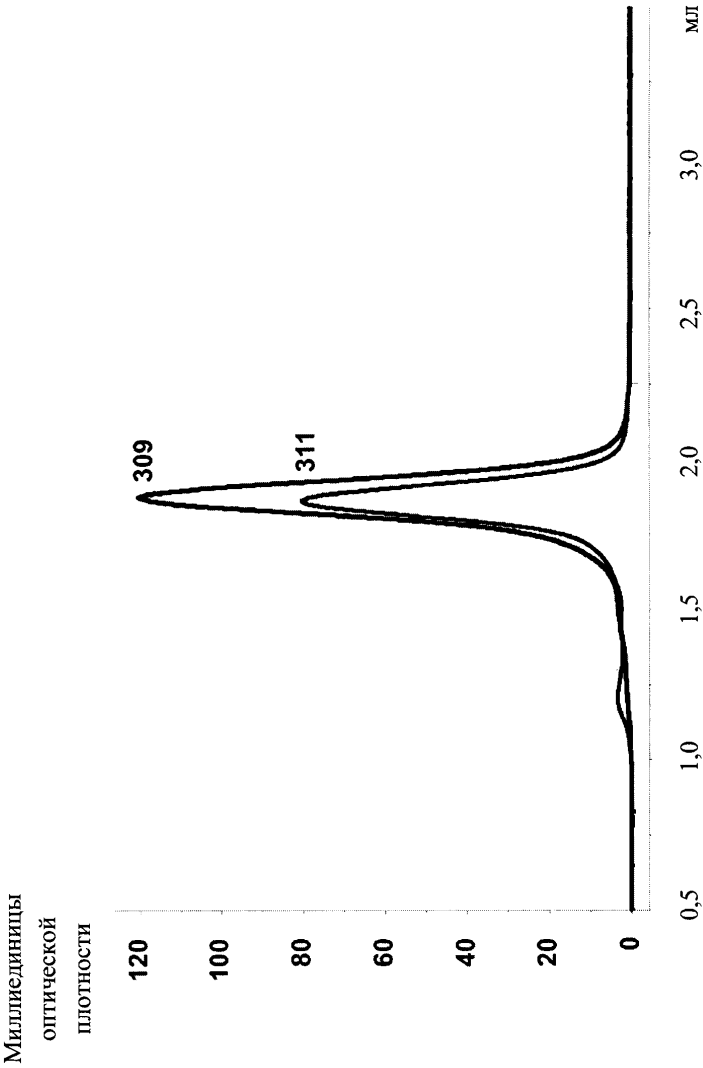
Фиг. 6А



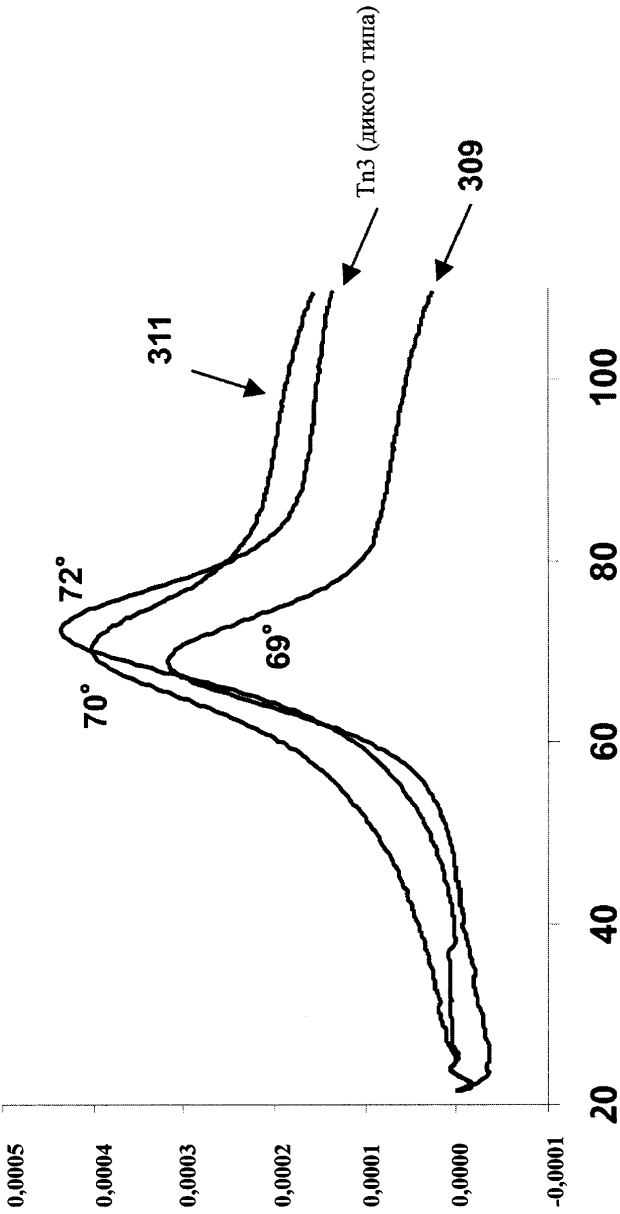
Фиг. 6В



23/52

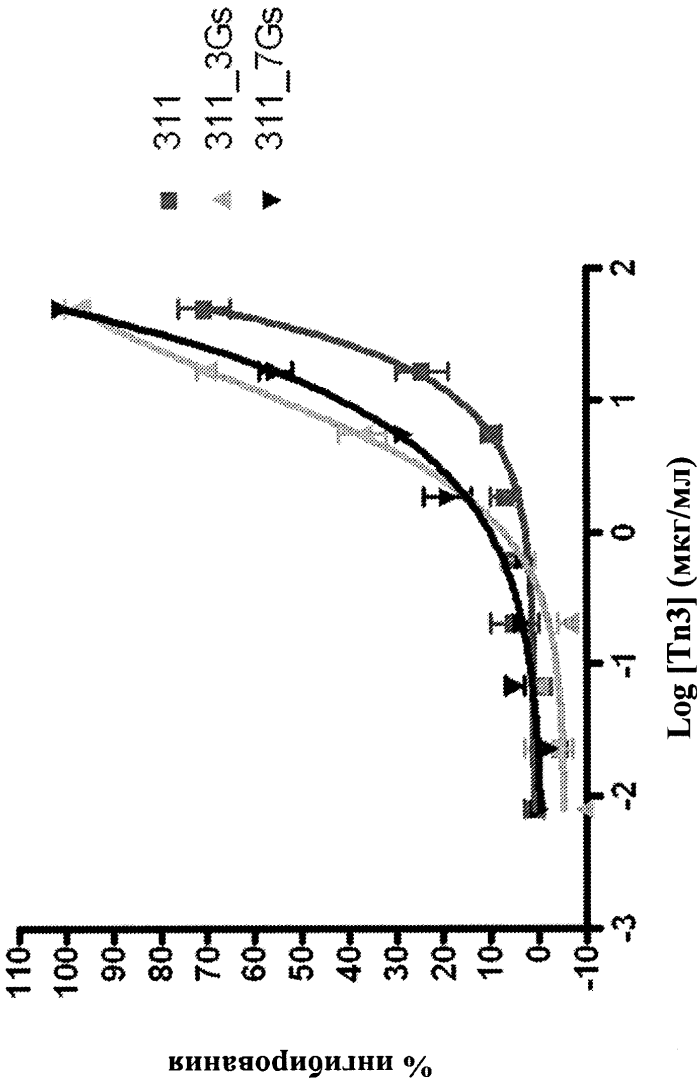


Фиг. 7А

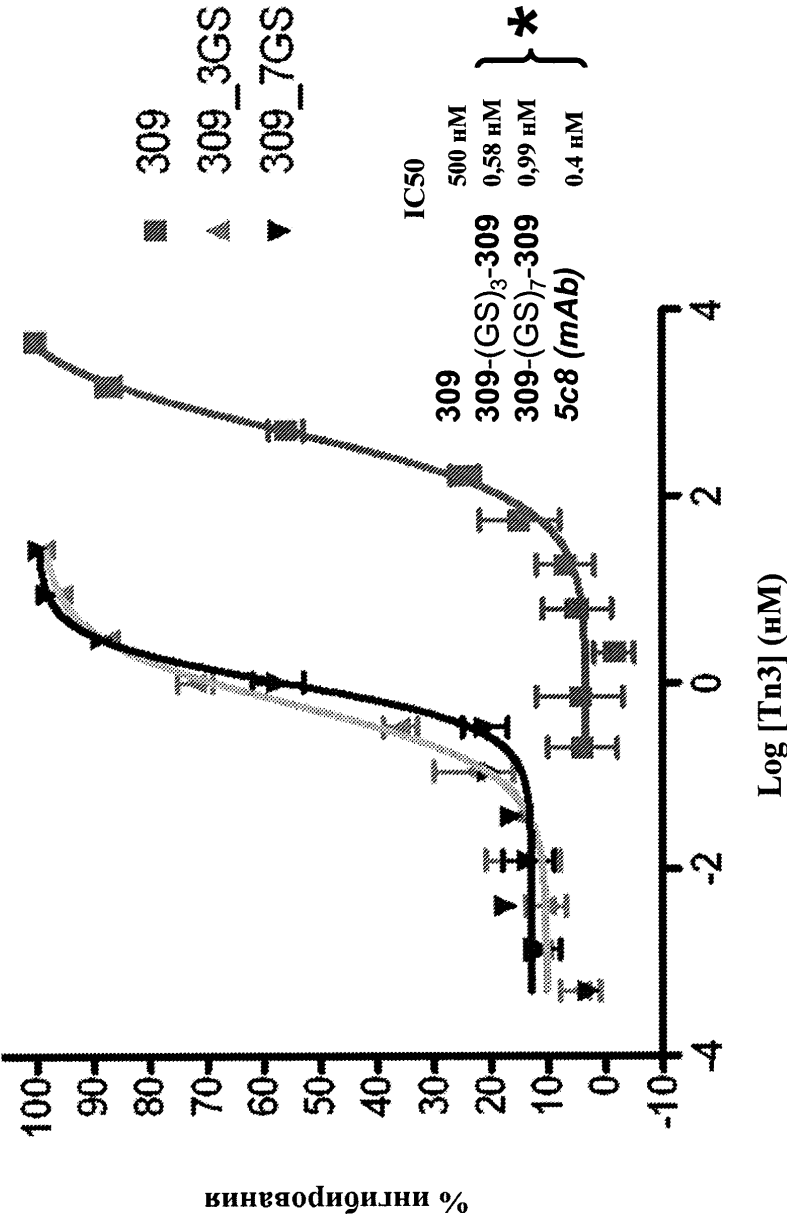


Фиг. 7В

25/52



Фиг. 8А



Фиг. 8В



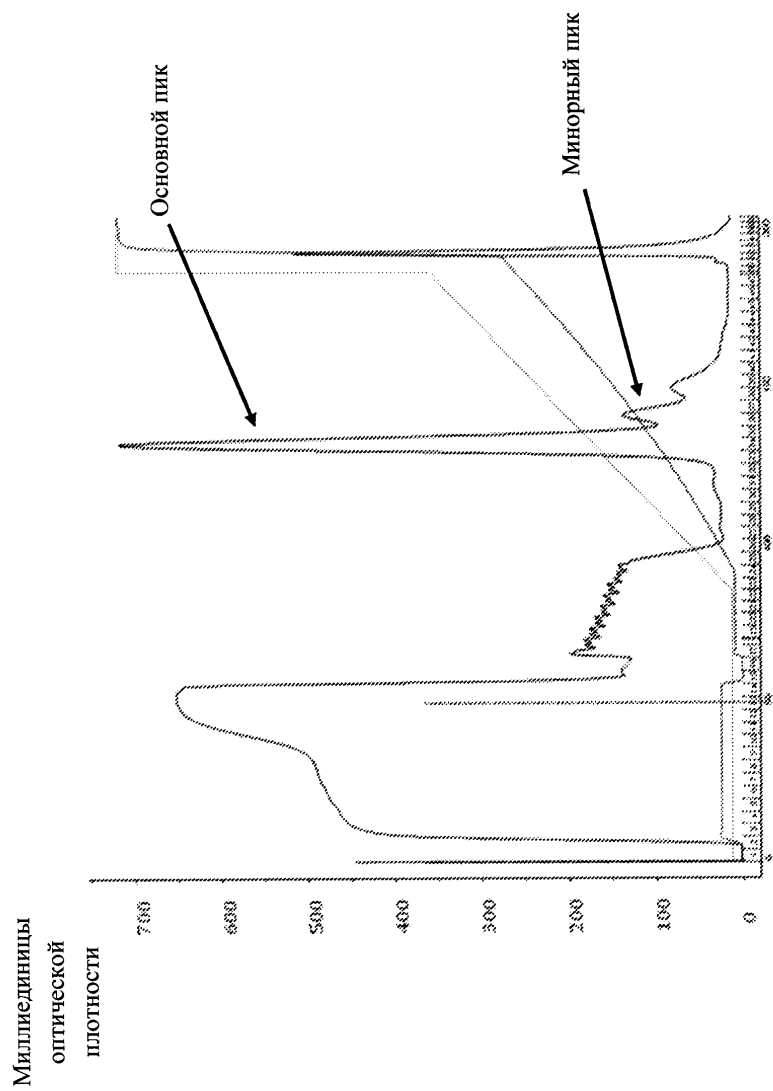
X1=S, или G, или A

X2=R, или S, или A

N=1-7

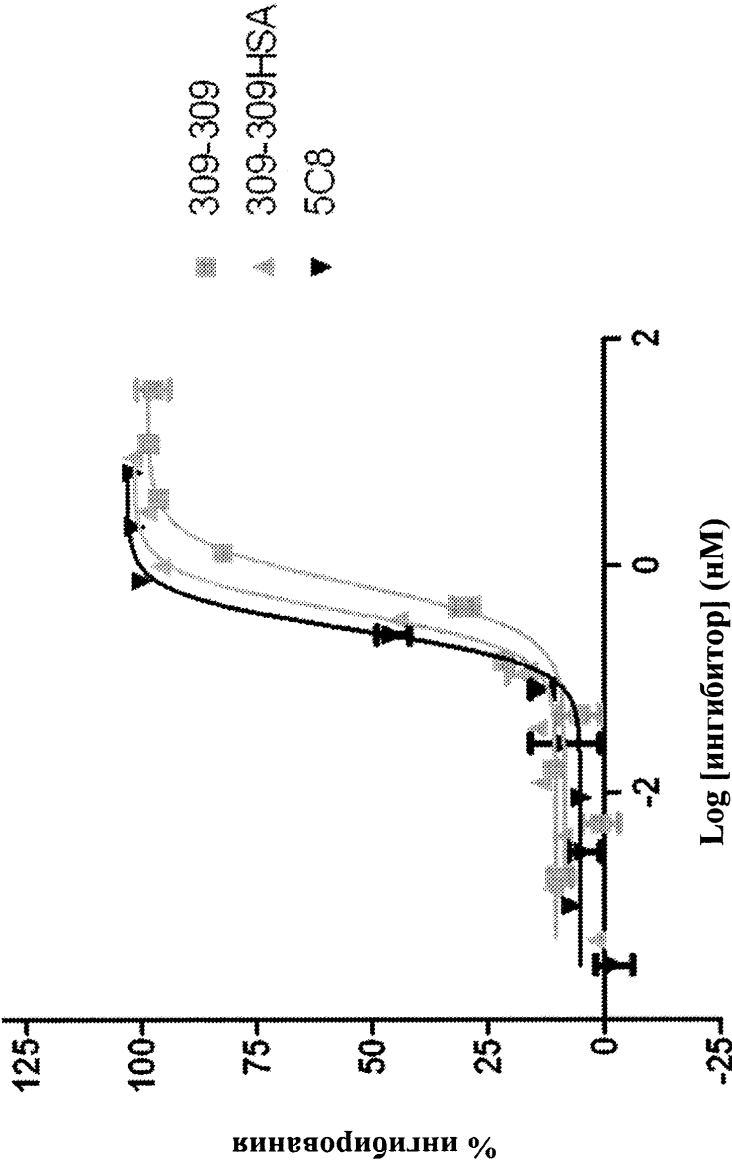
M=1-7

Фиг. 9А

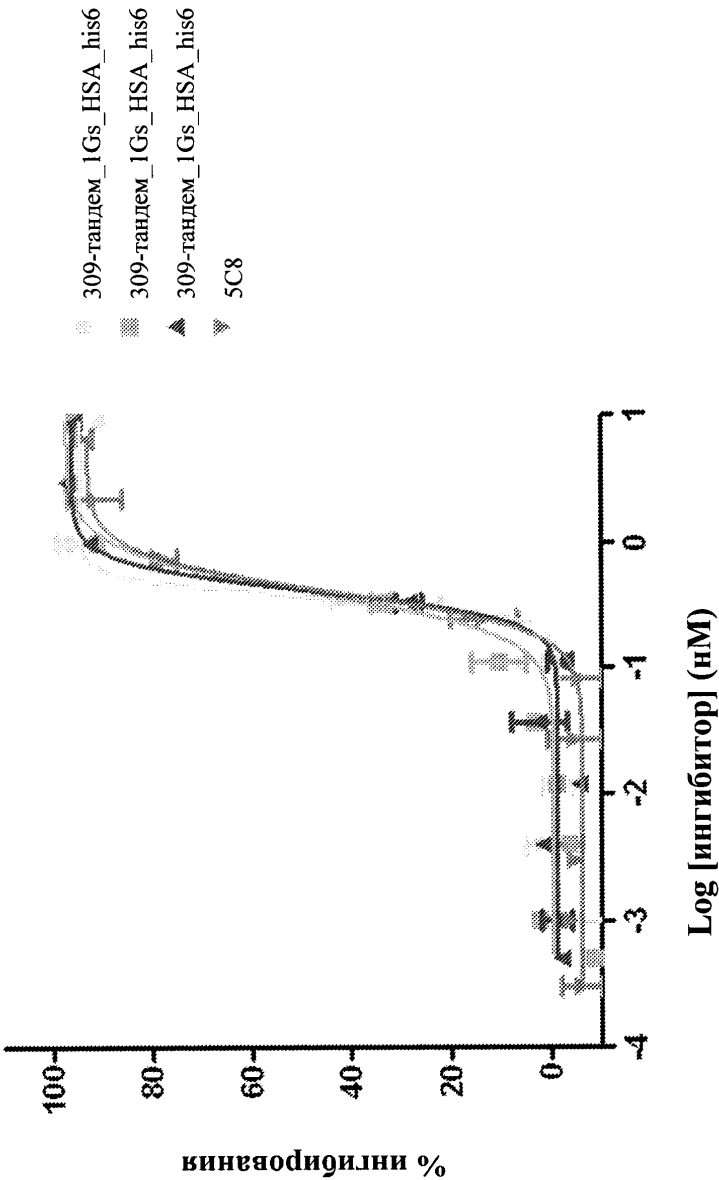


Фиг. 9В

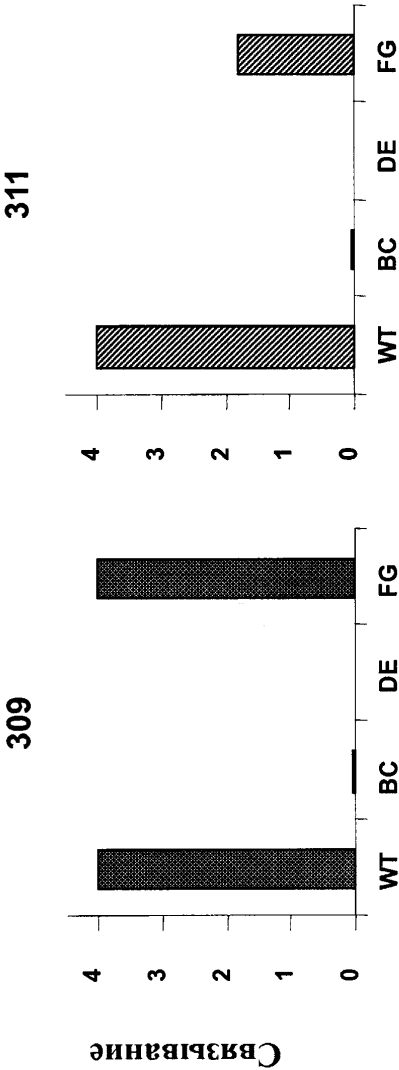
29/52



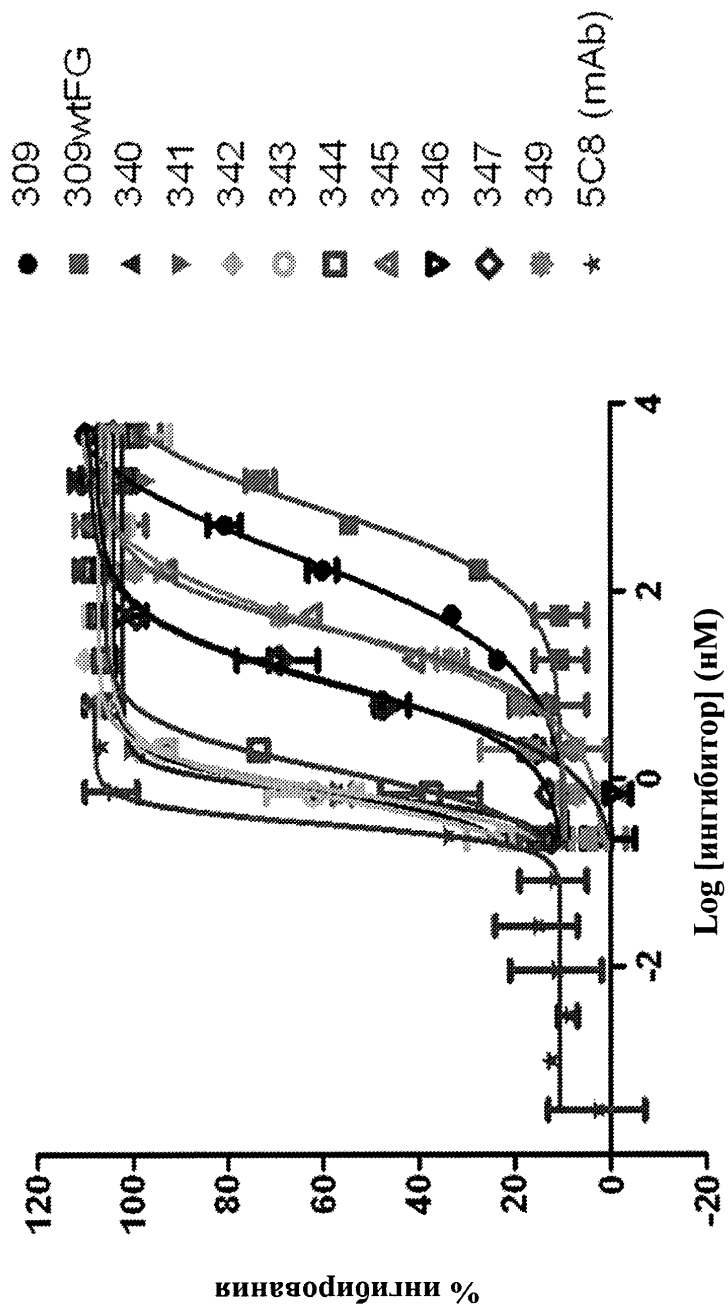
Фиг. 9С



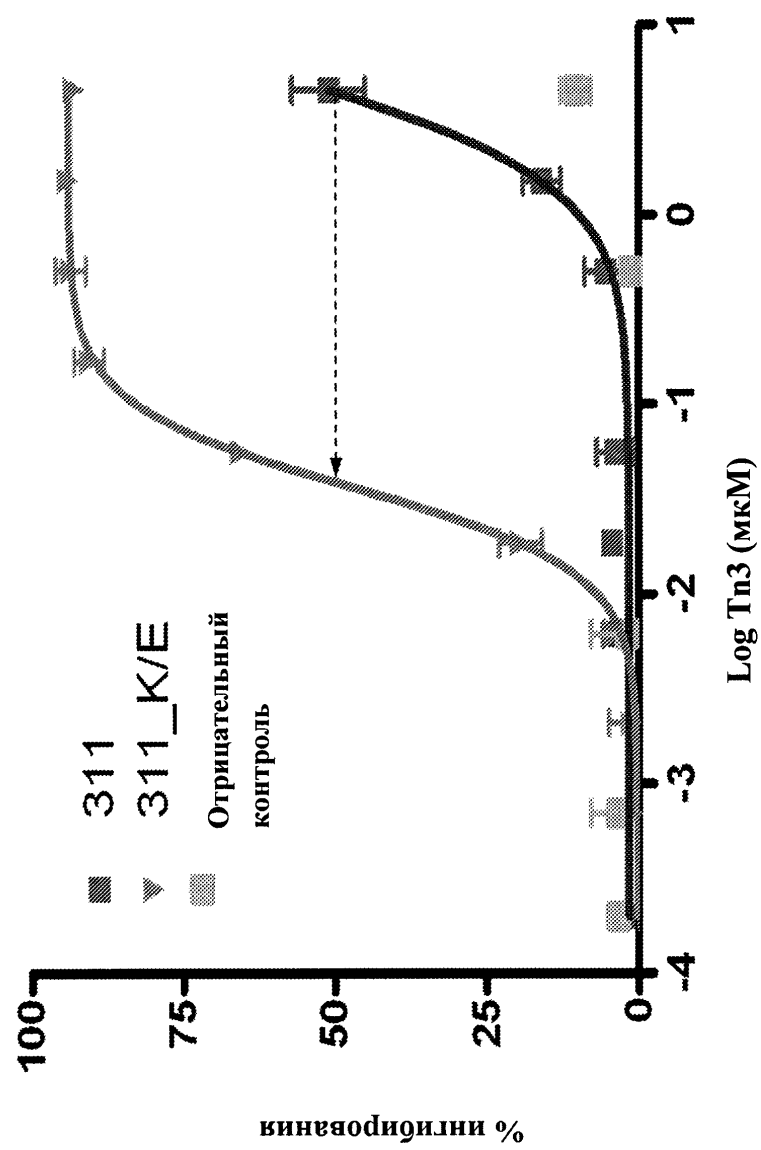
Фиг. 9D



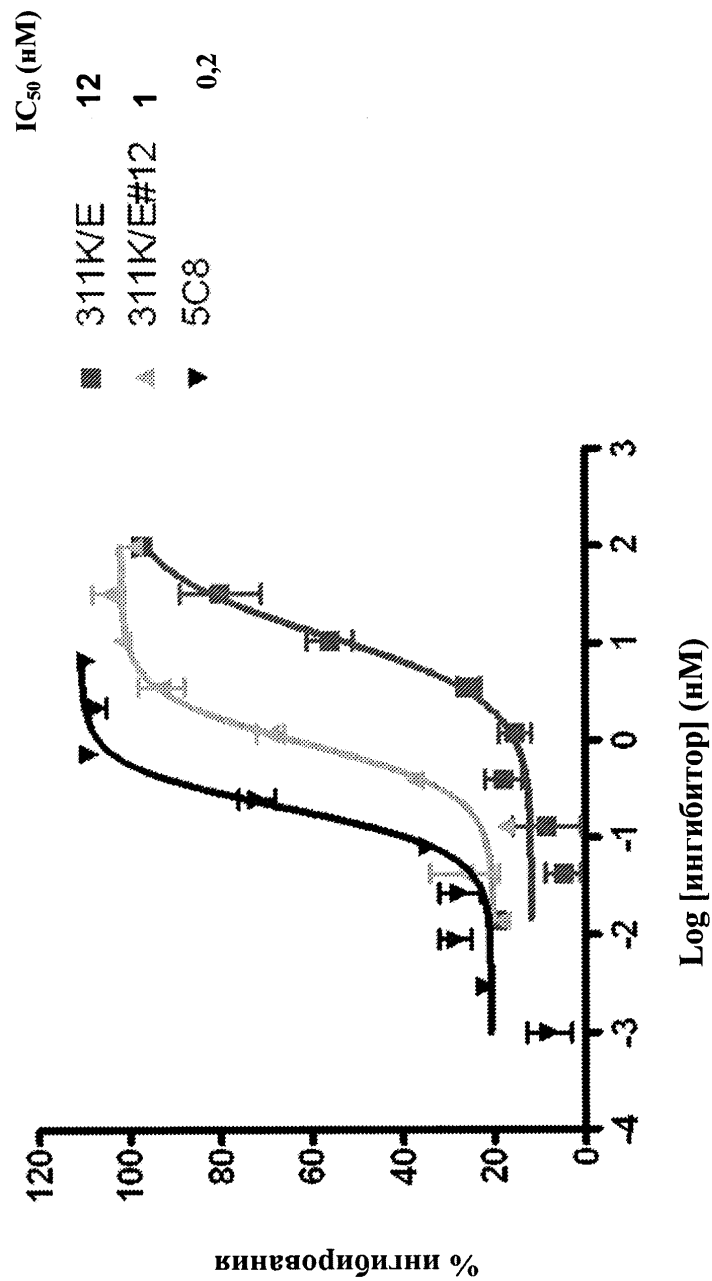
Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 10D

Петля ВС

309	I E V K D V T D T T A L I T W S D E F G H Y D G G	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
309FGwt	I E V K D V T D T T A L I T W S D E F G H Y D G G	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
340	I E V K D V T D T T A L I T W S D D F D N Y E W	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
341	I E V K D V T D T T A L I T W S D D F A D Y V W	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
342	I E V K D V T D T T A L I T W S D D F G E Y V W	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
343	I E V K D V T D T T A L I T W L D D W G S Y H V	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
344	I E V K D V T D T T A L I T W S D E V G D Y V V	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
345	I E V K D V T D T T A L I T W S D D F A E Y V G	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
346	I E V K D V T D T T A L I T W S D D F E E Y V V	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
347	I E V K D V T D T T A L I T W S D E V G Q Y V G	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
348	I E V K D V T D T T A L I T W S D D I G L Y V W	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
349	I E V K D V T D T T A L I T W S D E H A E F I G	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
Консенсусная последовательность	I E V K D V T D T T A L I T W X D X X X X X X X	C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42

Фиг. 11А

		Петля DE										Петля FG																													
309		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	Y	T	D	Q	E	A	G	N	P	A	K	E	T	F	T	83
309FGwt		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	83
340		L	W	Y	H	M	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	83
341		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	83	
342		L	W	Y	H	A	H	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	83	
343		L	W	Y	H	Q	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83	
344		L	W	Y	H	M	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83	
345		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83		
346		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83		
347		L	W	Y	H	M	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83	
348		L	W	F	H	Q	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83	
349		L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83		
Консенсусная		L	W	X	H	X	A	X	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	X	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	83	
последовательность																																									

Фиг. 11В

Петля ВС

311	IEVK	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44		
311K4E	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44		
311K4E_1	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	D	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_2	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	S	H	L	D	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_3	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	H	N	F	P	H	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_4	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	S	N	H	L	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_5	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	S	N	F	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_7	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	F	Y	S	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44
311K4E_8	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	Y	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_9	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_10	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	N	Y	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_11	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	N	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_12	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	S	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_13	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	A	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_14	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	A	Y	S	H	H	Y	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
311K4E_15	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	S	Y	A	N	Y	H	H	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44
311K4E_16	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	S	Y	S	D	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44
311K4E_19	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	A	Y	S	N	H	S	F	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44
311K4E_20	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	L	Y	A	N	F	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44
311K4E_21	IEVE	DV	TD	TAL	I	TW	TNRSS	Y	S	N	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	
	IEVX	DV	TD	TAL	I	TW	XXR	SS	XX	XX	XX	XX	XX	C	E	L	X	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	I	D	44	

Фиг. 12А

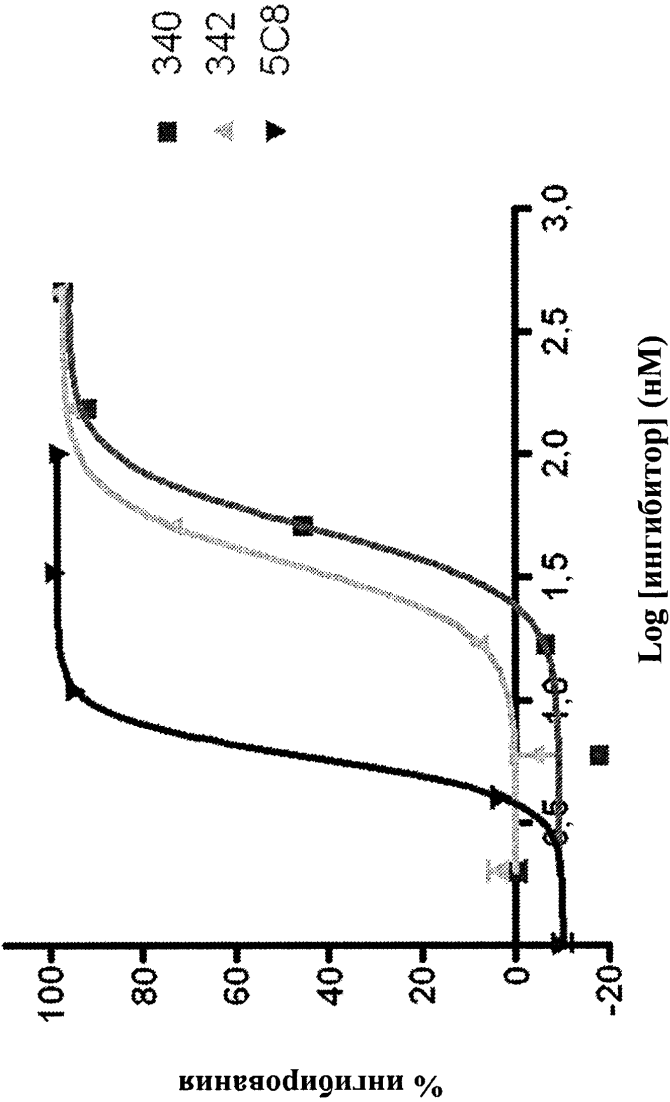
Петля FG

311	L S S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E	L S S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_1	L D Q I - Y V H Y S I G N L K P D T K Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_2	L S A A I Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	87
311K4E_3	L N S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_4	L N N I - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_5	L N S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_7	L N Q P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_8	L N Q P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_9	L S S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_10	L N Q P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_11	L N S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_12	L N Q P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_13	L N S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_14	L R Q P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_15	L E L - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	85
311K4E_16	L S S P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_19	L N T P - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_20	L E Q V - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
311K4E_21	L N Q V - Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y S N P A K E T F T T	86
̂	L X X X X Y V H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C L T T D G T Y X N P A K E T F T T	87

Консенсусная
последовательность

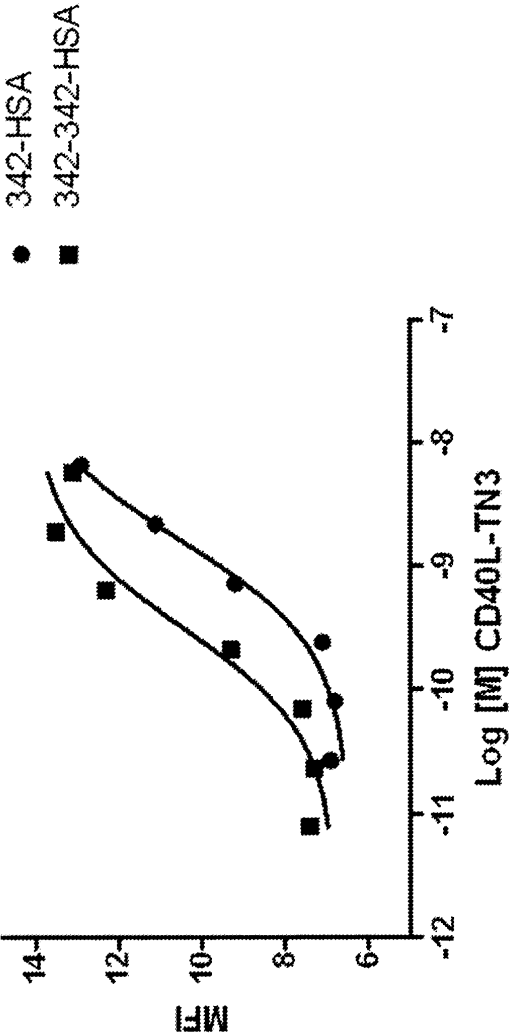
Фиг. 12В

39/52

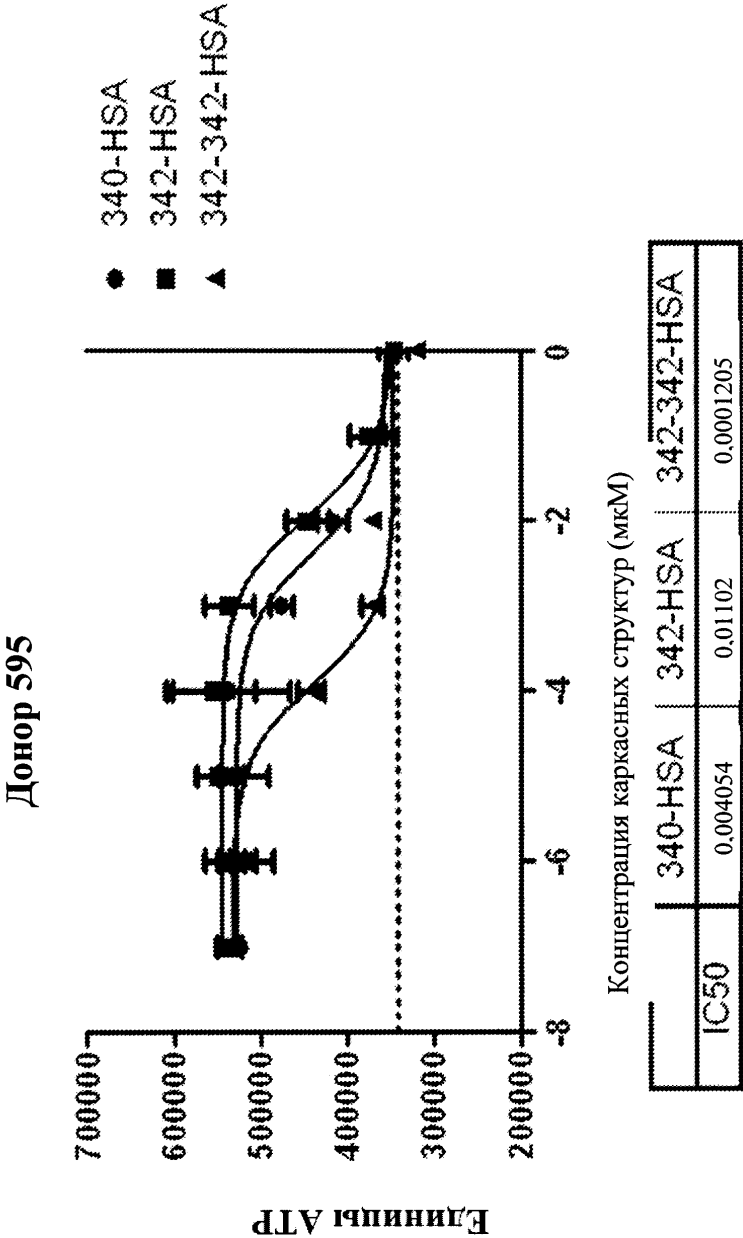


Фиг. 13

Связывание TN3, специфичных для CD40L, с Т-клетками CD4+, активлируемыми в течение 24 ч.

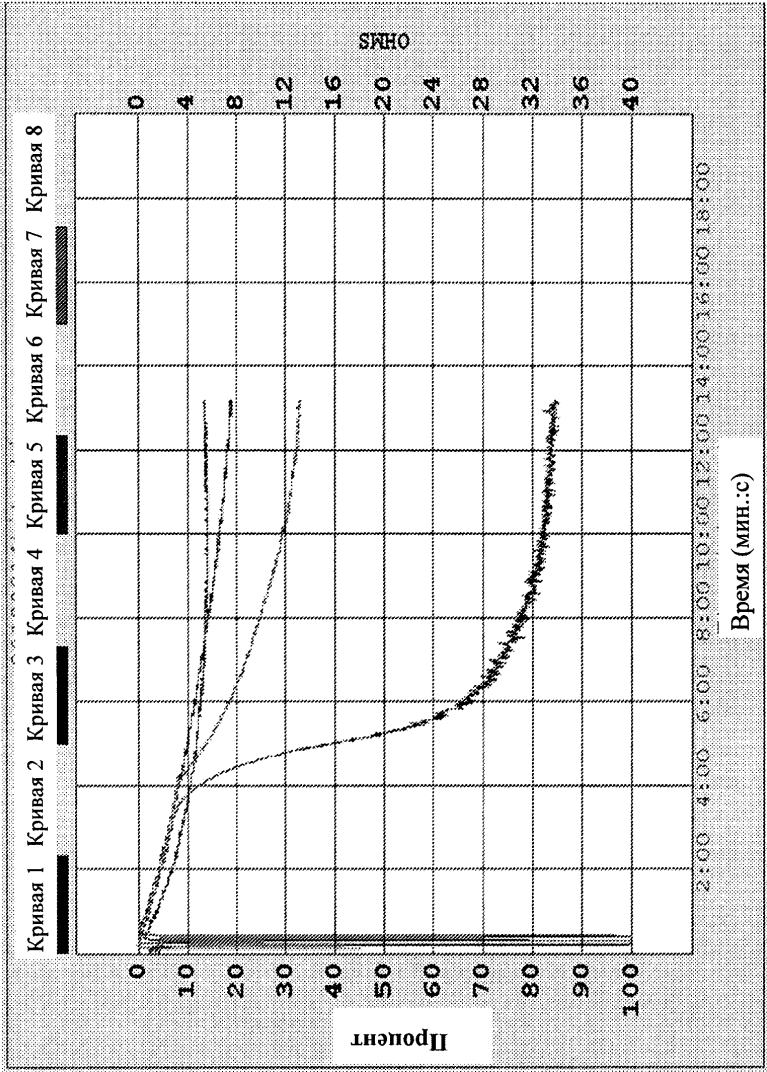


Фиг. 14



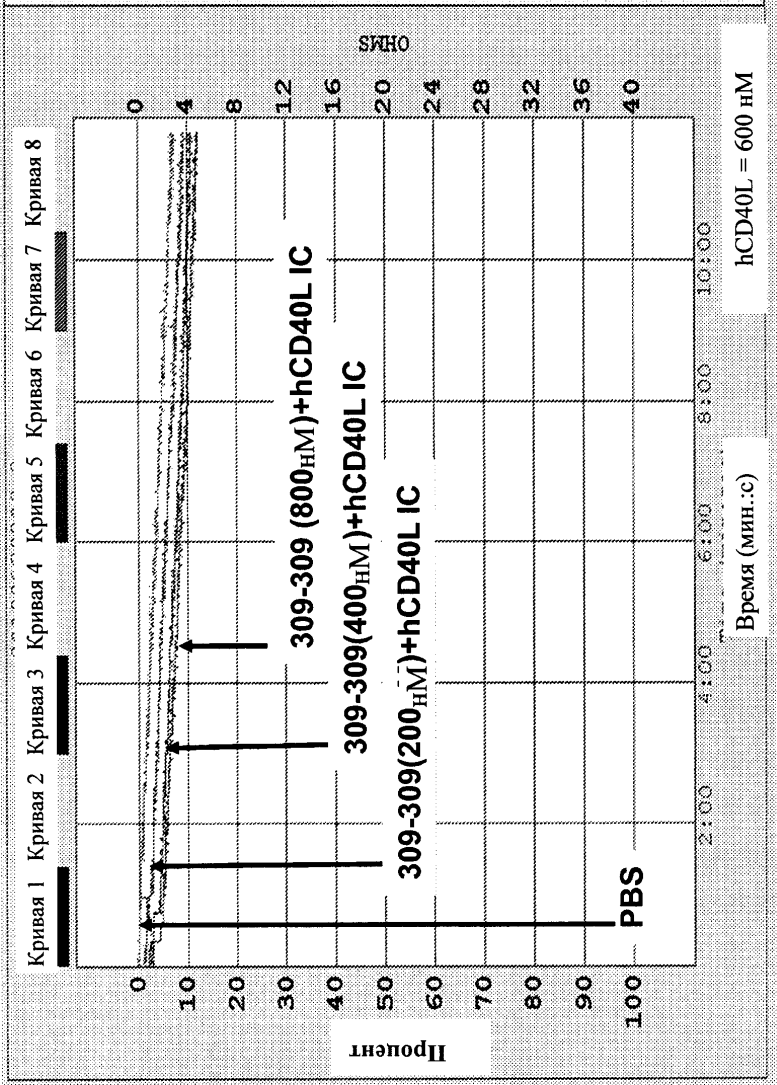
Фиг. 15

20100914-титрование



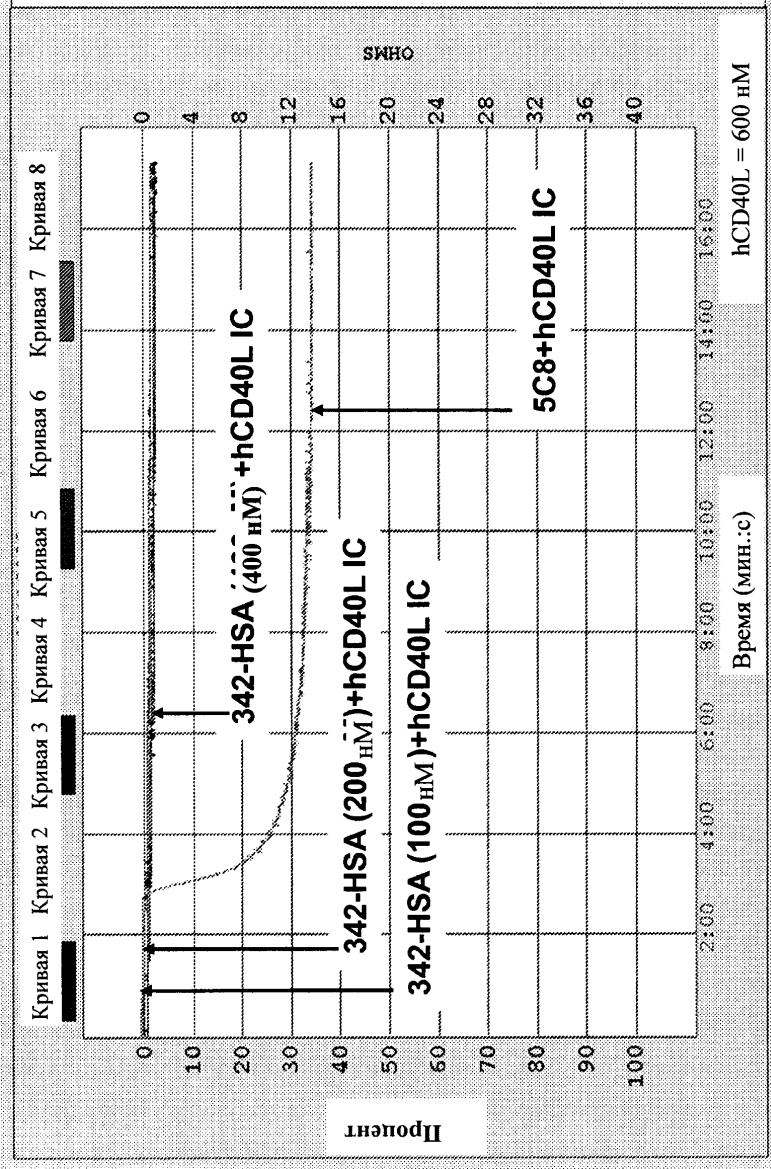
Фиг. 16А

20100930309-3gs

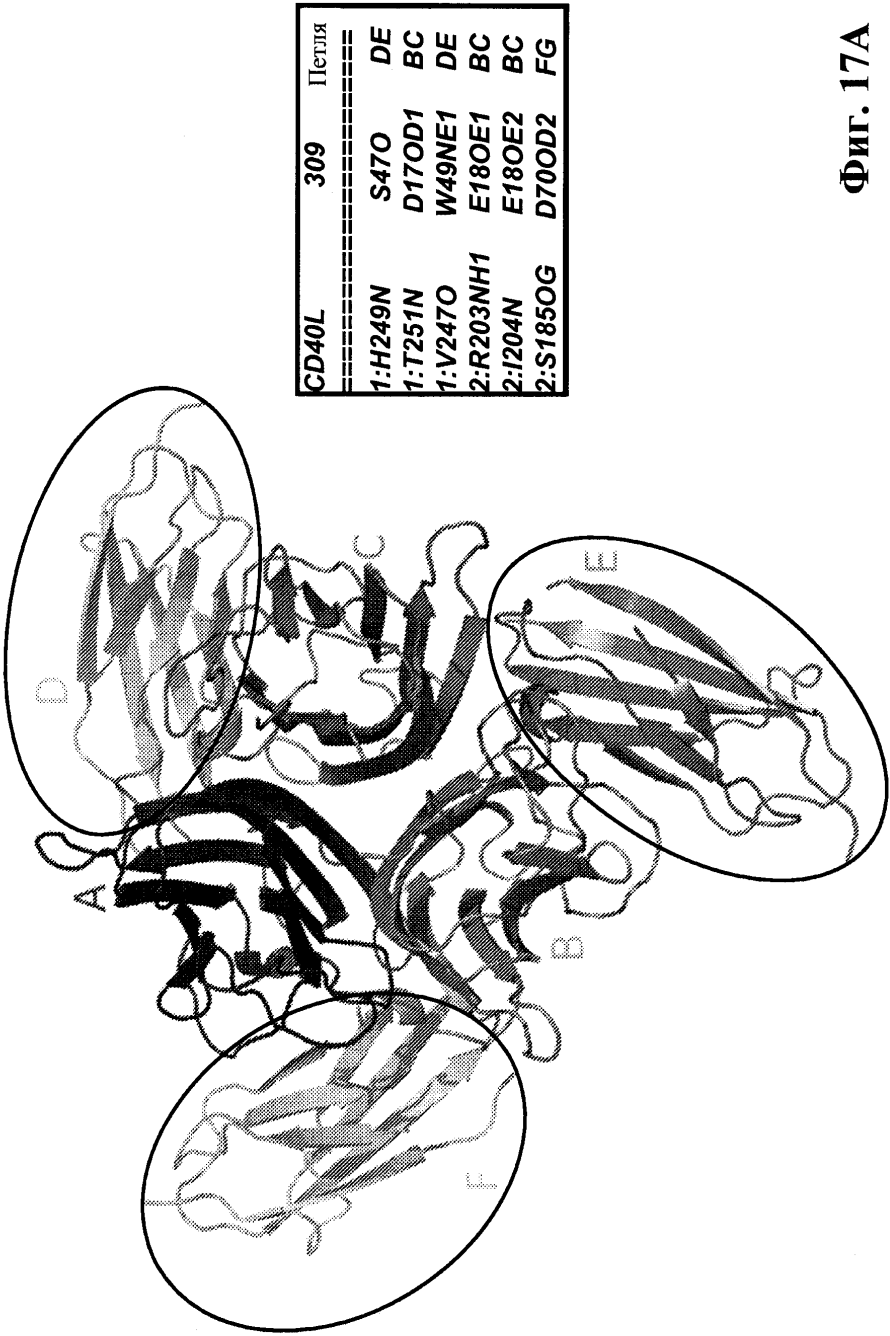


Фиг. 16В

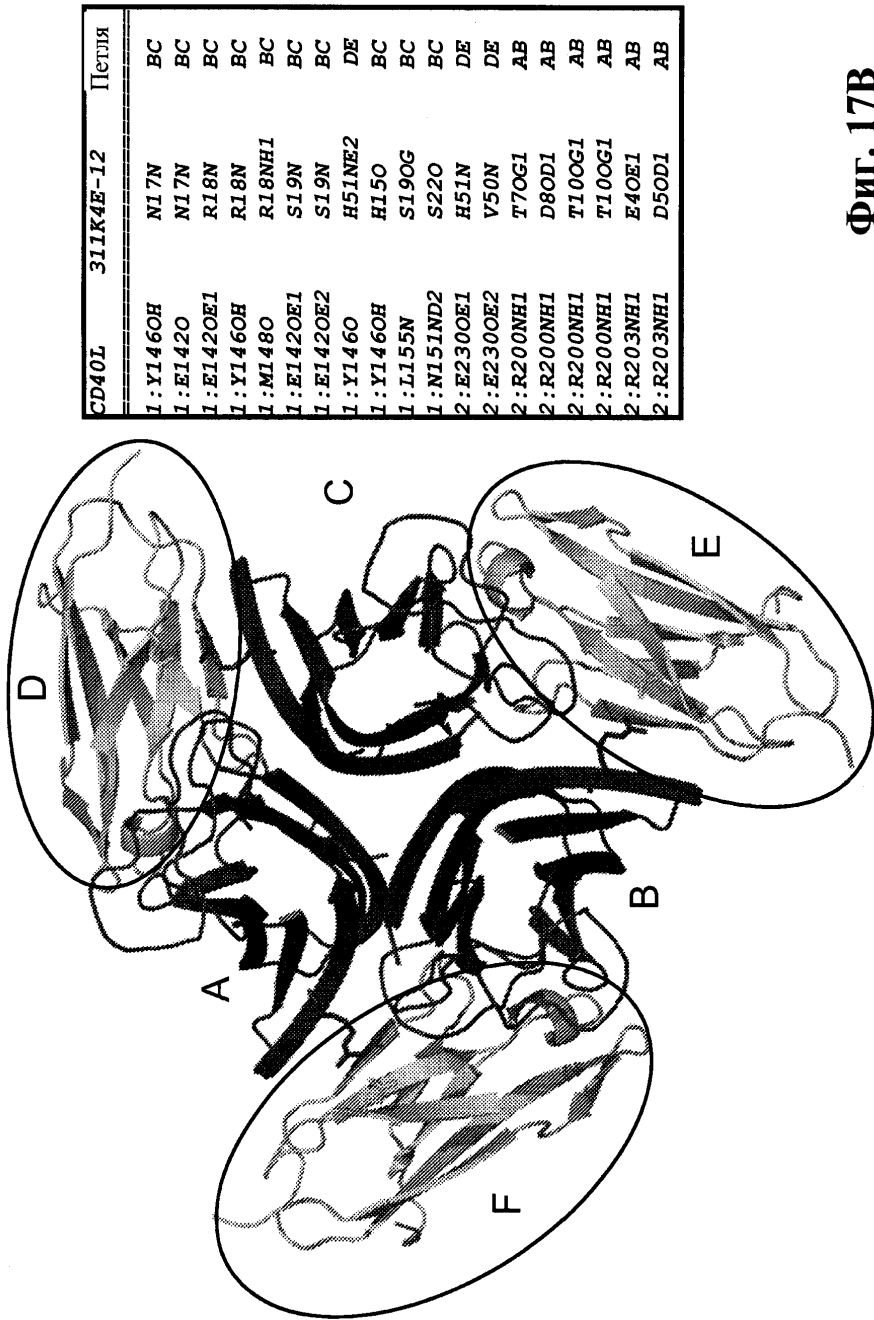
20110822



Фиг. 16С

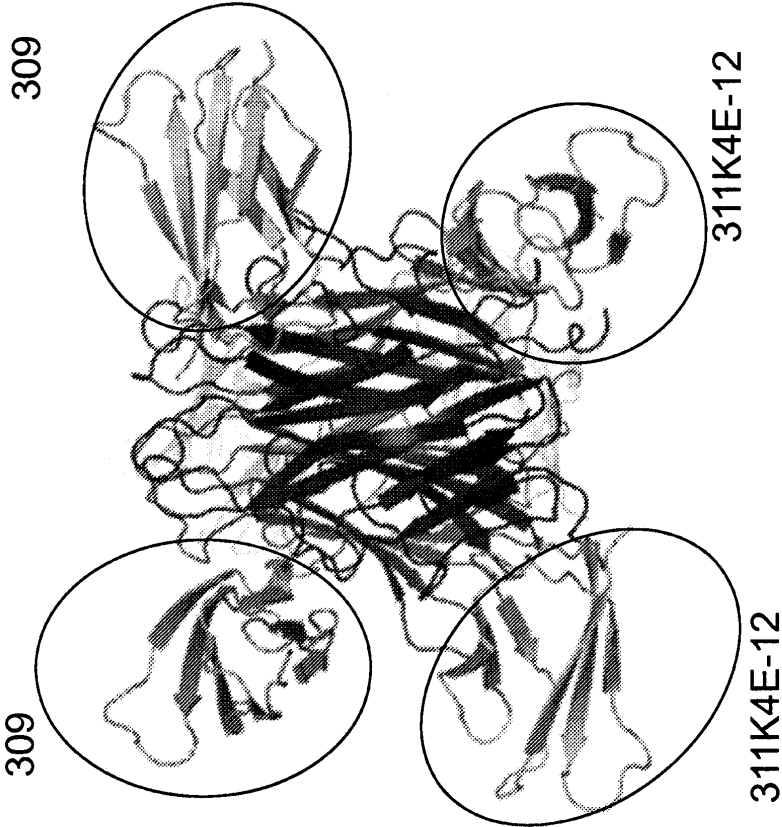


Фиг. 17А



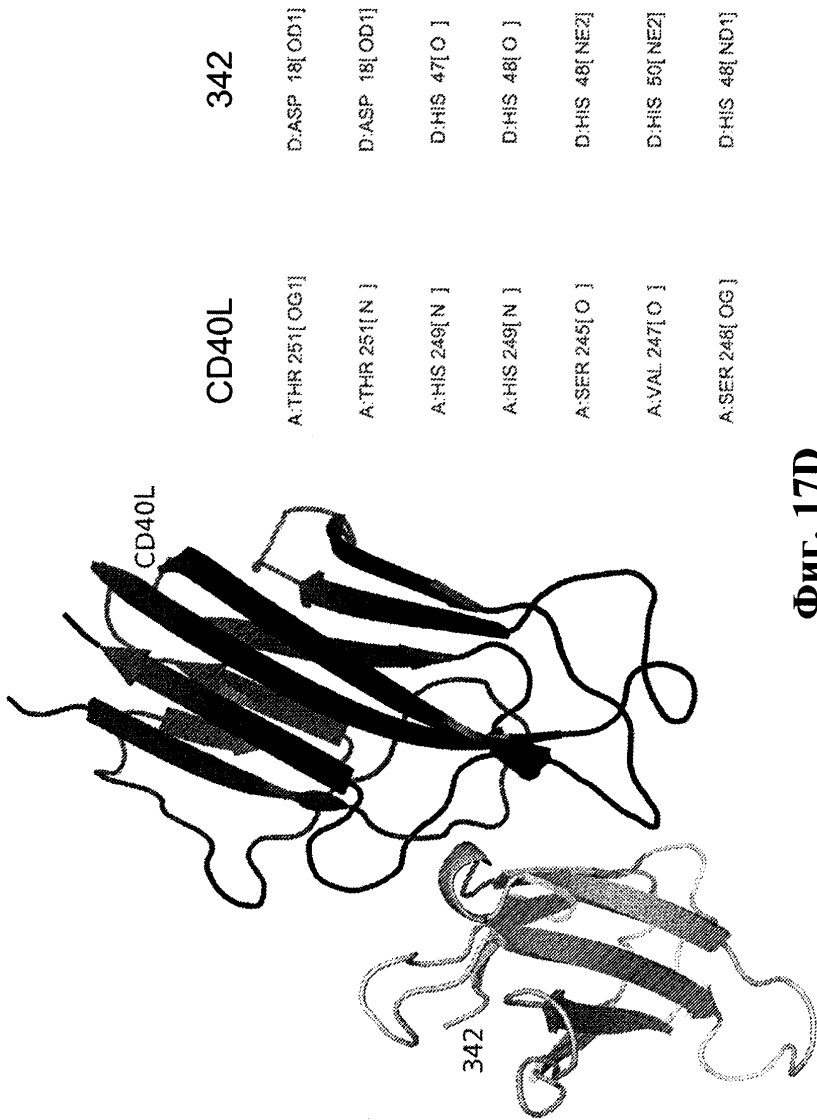
Фиг. 17В

47/52



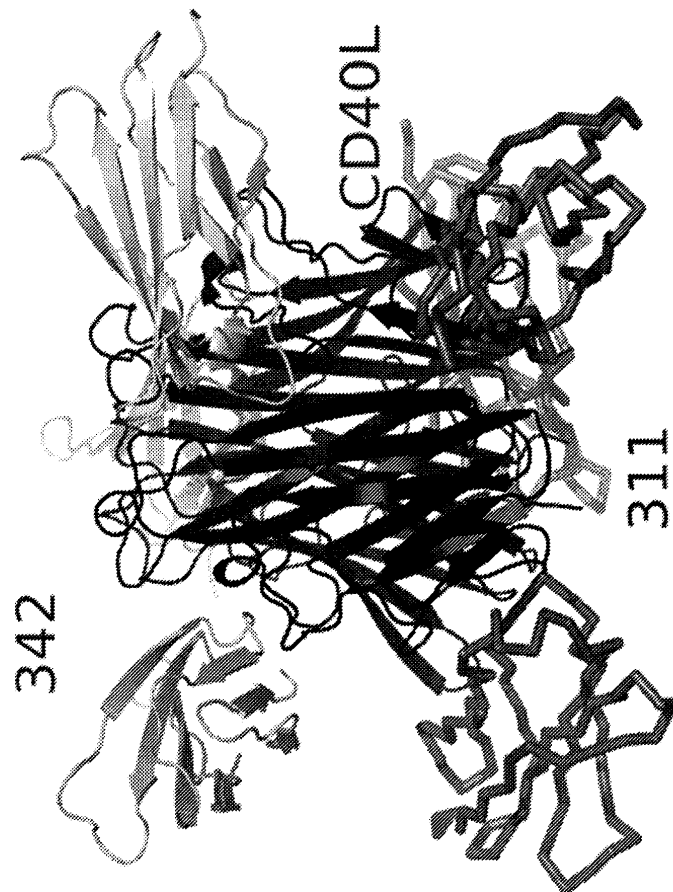
Фиг. 17С

48/52



Фиг. 17D

49/52



Фиг. 17Е

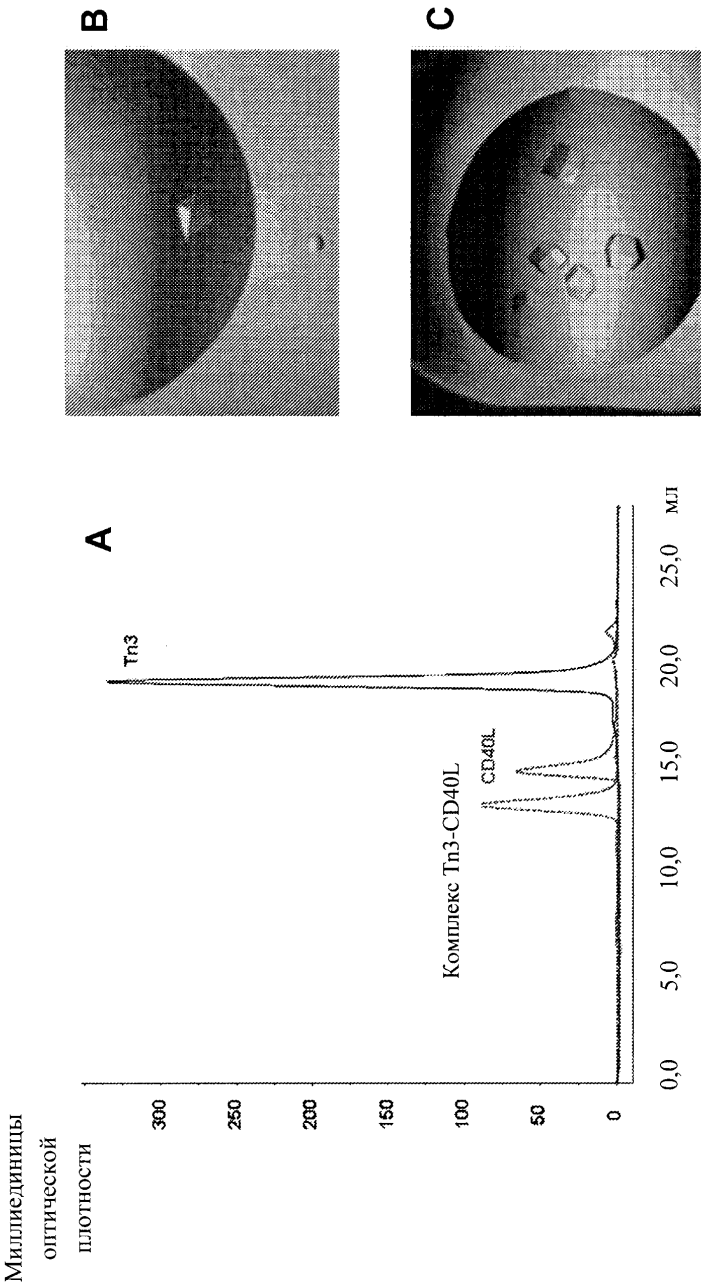
MIETYNQTSF RSAATGLPIS MKIERMLLTW FLITOMIGSA LEAVYLHRRRL DKIEDERNLH 60
EDFVEMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NNEETKNENS FEMQKGDQNP 120
QIAAHVISEA SSKTTSVLON A KGY T SN LNT ENGKQ LTVKROGLYY IYAOVTFCSN 180
REASSQAPFI ASICLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGO QSIHLGGVFE LOPGASVFEN 240
VTDPQVSHG TGFTSEGLLK L 261

Фиг. 18А

51/52

MIETYNOTSP RSAATGLPIS MKIEMYLLTV FLITQMIGSA LEAVYLHPRL DKIEDERNLH 60
 EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP 120
 QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKROGLYY IYAQVTFCSN 180
 REAS[SO]APFI ASLCLKSPGR FER[ILL]RAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN 240
 VTDP[SO]S[SHG] JGFTSFGLLK L 261

Фиг. 18B



Фиг. 19