

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090404** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.05.21

(51) Int. Cl. *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.31

(54) **УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПОСОБ ПРЕЗЕНТИРОВАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ПЕПТИДА НА БЕЛКОВОЙ СТРУКТУРЕ**

(31) **2017-148622**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.07.31**

Суга Хироаки, Такаги Дзунити (JP)

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2018/028705**

(74) Представитель:

(87) **WO 2019/026920 2019.02.07**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТОКИО;
ОСАКА ЮНИВЕРСИТИ (JP)**

(57) Настоящее изобретение относится к способу презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру. Циклический пептид содержит химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры. Способ включает замену химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, и, таким образом, слияние циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру.

202090404
A1

202090404

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560814ЕА/041

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПОСОБ ПРЕЗЕНТИРОВАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ПЕПТИДА НА БЕЛКОВОЙ СТРУКТУРЕ

Область техники

[1] Настоящее изобретение относится к способу презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, и т.п.

Уровень техники

[2] Существует известная технология модификации аминокислотного остатка белка или встраивания другой пептидной структуры в белок с целью получения белка, имеющего улучшенную активность.

В патентном документе 1 описывают химерный полипептид, имеющий улучшенную биологическую активность и содержащий белок сывороточный альбумин, имеющий биологическую активность иной пептидной последовательности, встроенной в него.

В патентном документе 2 описано, что модификации по меньшей мере одной петлевой области полипептида на основе FnIII, а также модификации β -листа полипептида на основе FnIII приводят к получению связывающей молекулы на основе FnIII с улучшенной связывающей способностью в отношении молекулы-мишени.

[3] В патентном документе 3 описывают молекулу, полученную посредством встраивания одного или более биоактивных пептидов в Fc-домен белка антитела. Более конкретно, биоактивный пептид встраивают в аминокислотные остатки, смежные друг с другом, в петлевой области Fc-домена.

В патентном документе 4, схожем с патентным документом 3, описывают модифицированную молекулу Fc. Описывают молекулу Fc, имеющую дополнительную функциональную часть, ковалентно связанную через боковую цепь аминокислотного остатка в участке конъюгации. Более конкретно, аминокислотный остаток в участке конъюгации является остатком цистеина.

[4] Кроме того, в патентных документах 5 и 6 описывают технологию модификации по меньшей мере одного участка структурной петли иммуноглобулина и, таким образом, получение иммуноглобулина с новой связывающей способностью.

[5] В патентном документе 2 описано, что связывающую активную молекулу для мишени получают из библиотеки рандомизированных пептидных последовательностей, встроенных в петлевую часть FnIII.

Кроме того, в патентных документах 5 и 6 описано, что активную молекулу, имеющую связывающую активность по отношению к мишени, получают посредством скрининга библиотеки, полученной не встраиванием существующего пептида, а встраиванием рандомизированной пептидной последовательности в один участок специфической структурной петли иммуноглобулина.

Это означает, что с помощью описанных выше общепринятых технологий

получают только библиотеку, содержащую встроенный рандомизированный пептид, и в отношении пептидной части, инсерцию которой идентифицируют посредством скрининга библиотеки, неизвестно, можно ли поддерживать связывающую активность в отношении мишени с помощью лишь самого пептида. Другими словами, встроенный пептид имеет последовательность, встроенную для получения библиотеки, и не ожидают, что он будет иметь связывающую способность. Кроме того, неизвестно, можно ли поддерживать взаимозаменяемость белков, например, можно ли поддерживать исходную активность пептида, презентуемого иммуноглобулином, даже после повторного встраивания в F_nIII.

Документы предшествующего уровня техники

Патентный документ

[6] Патентный документ 1: Перевод заявки РСТ № 2005-505243 на японский язык

Патентный документ 2: Перевод заявки РСТ № 2013-539362 на японский язык

Патентный документ 3: Перевод заявки РСТ № 2008-514201 на японский язык

Патентный документ 4: Перевод заявки РСТ № 2009-504164 на японский язык

Патентный документ 5: Перевод заявки РСТ № 2009-541361 на японский язык

Патентный документ 6: Перевод заявки РСТ № 2009-540837 на японский язык

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая задача

[7] Целью настоящего изобретения является получение способа презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, с использованием белка в качестве каркаса при сохранении структуры и активности, которые имеет циклический пептид.

Решение задачи

[8] Далее подробно описано настоящее изобретение.

(1) Способ презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, включает:

использование в качестве циклического пептида, содержащего химически перекрестно сшитую структуру, для получения внутримолекулярной циклической структуры, и

замену химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, и слияние циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру.

(2) Способ по п.(1), где два аминокислотных остатка, образующих петлевую структуру, имеют расстояние между C α -атомами в диапазоне от 4 до 7 Å.

(3) Способ по п.(1) или (2), где белок, содержащий петлевую структуру, содержит от 1 до 15 аминокислотных остатков между двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

(4) Способ по любому из пп.(1)-(3), где циклический пептид состоит из протеиногенной аминокислоты и/или непротеиногенной аминокислоты.

(5) Способ по любому из пп.(1)-(4), где химически перекрестно сшитая структура содержит тиозфирную связь или дисульфидную связь.

(6) Способ по любому из пп.(1)-(5), где каждый из двух или более циклических пептидов подвергают слиянию с соответствующим образом отличающимися петлевыми структурами белка, содержащего множество петлевых структур.

(7) Способ по п.(6), где два или более циклических пептида имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

(8) Способ по п. (6), где два или более циклических пептида имеют соответствующим образом отличающиеся аминокислотные последовательности.

(9) Способ по любому из пп.(1)-(8), где при замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, химически перекрестно сшитую структура циклического пептида с помощью линкерной последовательности заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

(10) Способ по любому из пп.(1)-(9), где химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, одновременно включая аминокислотную последовательность, образующую петлевую структуру, иную, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру.

(11) Способ слияния циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру, и, таким образом, получения модифицированного белка, содержащего циклический пептид, презентруемый на белке, включающий:

использование в качестве циклического пептида, содержащего химически перекрестно сшитую структуру, для получения внутримолекулярной циклической структуры,

выбор из аминокислотной последовательности циклического пептида частичной аминокислотной последовательности, предназначенной для презентирования на белке, и выбор последовательности оснований, соответствующей частичной аминокислотной последовательности,

выбор последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным последовательностям, образующим петлевую структуру белка, содержащего петлевую структуру, соответственно, удаление основания, находящегося между выбранными последовательностями оснований, при необходимости, и получение нуклеиновой кислоты, содержащей встроенную последовательность оснований, соответствующую частичной аминокислотной последовательности выбранного циклического пептида, и трансляцию нуклеиновой кислоты.

(12) Способ по п.(11), где два аминокислотных остатка, образующих петлевую структуру, имеют расстояние между C α -атомами в диапазоне от 4 до 7 Å.

(13) Способ по п.(11) или (12), где белок, содержащий петлевую структуру, содержит от 1 до 15 аминокислотных остатков между двумя аминокислотными остатками,

образующими петлевую структуру.

(14) Способ по любому из пп.(11)-(13), где циклический пептид состоит из протеиногенной аминокислоты и/или непротеиногенной аминокислоты.

(15) Способ по любому из пп.(11)-(14), где химически перекрестно сшитая структура включает тиозфирную связь или дисульфидную связь.

(16) Способ по любому из пп.(11)-(15), где два или более циклических пептида подвергаются слиянию с соответствующим образом отличающимися петлевыми структурами белка, содержащего множество петлевых структур.

(17) Способ по п.(16), где два или более циклических пептида имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

(18) Способ по п.(16), где два или более циклических пептида имеют соответствующим образом отличающиеся аминокислотные последовательности.

(19) Способ по любому из пп.(11)-(18), где при замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида с помощью линкерной последовательности заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

(20) Способ по любому из пп.(11)-(19), где химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, при одновременном включении аминокислотной последовательности, образующей петлевую структуру, иной, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру.

(21) Модифицированный белок, полученный способом получения по любому из пп.(11)-(20).

Преимущество изобретения

[9] Настоящее изобретение делает возможным предоставление способа презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, при сохранении структуры и активности циклического пептида с использованием белка в качестве каркаса.

Краткое описание чертежей

[10] На фиг. 1 показана структура циклических пептидов, использованных в примерах. В формуле циклических пептидов S соответствует атому серы, полученному из тиоловой группы Cys, Хаа соответствует произвольной аминокислоте, и s означает произвольное целое число 0 или более. В варибельной области показана аминокислотная последовательность, образующая внутреннюю структуру циклического пептида, с помощью однобуквенного кода, и аминокислоты, указанные строчными буквами (w, y или т.п.), являются аминокислотами в D-форме (D-Trp, D-Tyr).

На фиг. 2 показана стерическая структура десятого домена повтора типа III фибронектина, используемого в качестве каркасного белка. Петлевая структура в десятом домене повтора типа III состоит из петлевой структуры из 8 аминокислотных остатков

между Val1490 в качестве B_N и Ser1499 в качестве B_C .

На фиг. 3 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием десятого домена повтора типа III фибронектина человека в качестве каркасного белка. Последовательность между Val1490 (B_N) и Ser1499 (B_C) является последовательностью инсерции. TGR и SPA в последовательности инсерции является аминокислотной последовательностью, полученной из десятого домена повтора типа III фибронектина человека, подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 4 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS Fn10-Fc и его слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемыми и секретируемыми клетками Eхрi293F.

На фиг. 5 показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами Fn10-Fc) и связывающими молекулами.

На фиг. 6 показана стерическая структура полученной из IgG человека Fc-области, используемой в качестве каркасного белка. Петлевые структуры в полученной из IgG человека Fc-области, показанные как участки L1-L8, соответственно, состоят в каждом участке из аминокислотного остатка, представленного B_N , аминокислотного остатка, представленного B_C , и петлевой области из 1-3 аминокислотных остатков между ними.

На фиг. 7 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием полученной из IgG человека Fc-области в качестве каркасного белка. Слитые белки с циклическим пептидом в участках L1-L3 в "верхней части" вблизи шарнирной области Fc-области показаны как мутанты по участкам L1-L3, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 8 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием полученной из IgG человека Fc-области в качестве каркасного белка. Слитые белки с циклическим пептидом в участках L4-L6 в "нижней части" Fc-области показаны как мутанты по участкам L4-L6, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 9 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием полученной из IgG человека Fc-области в качестве каркасного белка. Слитые белки с циклическим пептидом в участках L7 и L8 в "части

боковой поверхности" Fc-области показаны как мутанты по участкам L7-L8, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 10 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS Fc и ее слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемых и секретируемых клетками Expi293F.

На фиг. 11 показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами Fc) и связывающими молекулами.

На фиг. 12 показана стерическая структура целого IgG человека, используемого в качестве каркасного белка. Петлевые структуры в Fc-области, используемые для слияния, показаны как участки L1-L8 на фиг. 6-9 и здесь, их положение указано как срединная точка соответствующих аминокислотных остатков, представленных V_N и V_C на фиг. 6.

На фиг. 13А показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS IgG и его слитого белка с циклическим пептидом, экспрессируемых и секретируемых клетками Expi293F. На фиг. 13В показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами IgG) и связывающей молекулой.

На фиг. 14 показана стерическая структура сывороточного альбумина человека, используемого в качестве каркасного белка. Петлевые структуры сывороточного альбумина человека, указанные по участкам L1-L4, в каждом участке состоят из аминокислотного остатка, представленного V_N , аминокислотного остатка, представленного V_C , и петлевой области из двух или четырех аминокислотных остатков между ними.

На фиг. 15 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием сывороточного альбумина человека в качестве каркасного белка. Слитые белки, полученные посредством слияния с циклическим пептидом в участках L1-L4, показаны как мутанты по участкам L1-L4, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 16 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS HSA и его слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемых и секретируемых клетками Expi293F.

На фиг. 17 показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами HSA) и связывающими молекулами.

На фиг. 18 показана стерическая структура гормона роста человека, используемого в качестве каркасного белка. Петлевые структуры гормона роста человека, показанные как участки L1 и L2, соответственно, в каждом участке состоят из аминокислотного остатка, представленного V_N , аминокислотного остатка, представленного V_C , и петлевой области из одного аминокислотного остатка между ними.

На фиг. 19 показана аминокислотная последовательность петлевой части после

слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием гормона роста человека в качестве каркасного белка. Слитые белки, полученные с использованием циклического пептида в участках L1 и L2, показаны как мутанты по участкам L1 и L2, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 20А показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS hGH и его слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемые и секретируемые клетками Expi293F. На фиг. 20В показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами hGH) и связывающей молекулой.

На фиг. 21 показана стерическая структура сывороточного ретинолсвязывающего белка человека, используемого в качестве каркасного белка. Петлевые структуры сывороточного ретинолсвязывающего белка человека, показанные как участки L1 и L2, соответственно, в каждом участке состоят из аминокислотного остатка, представленного V_N , аминокислотного остатка, представленного V_C , и петлевой области из двух аминокислотных остатков между ними.

На фиг. 22 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием сывороточного ретинолсвязывающего белка человека в качестве каркасного белка. Показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом. Слитые белки, полученные с использованием циклического пептида в участках L1 и L2, показаны как мутанты по участкам L1 и L2, соответственно. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 23А показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS сывороточного ретинолсвязывающего белка человека (RBP) и его слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемых и секретируемых клетками Expi293F. На фиг. 23В показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами RBP) и связывающей молекулой.

На фиг. 24 показана стерическая структура плацентарной щелочной фосфатазы человека, используемой в качестве каркасного белка. Петлевая структура плацентарной щелочной фосфатазы человека в каждом участке состоит из Lys402 в качестве V_N , Gly404 в качестве V_C и петлевой области из одного аминокислотного остатка между ними.

На фиг. 25 показана аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом, представляющая собой частичную структуру слитого белка, полученного с использованием плацентарной щелочной фосфатазой человека в качестве каркасного белка. Подчеркнутая часть представляет собой аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, и серыми буквами указана линкерная последовательность.

На фиг. 26 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS плацентарной щелочной фосфатазы человека (PLAP) и ее слитых белков с циклическим пептидом, экспрессируемых и секретируемых клетками Expi293F.

На фиг. 27 показаны результаты анализа взаимодействия между слитыми белками с циклическим пептидом (мутантами PLAP) и связывающими молекулами.

На фиг. 28 показан эффект слитых белков с пептидом mP6-9 (мутантов Fc) в отношении ингибирования передачи сигнала плексина В1.

Описание вариантов осуществления

[11] Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет описано конкретно с помощью вариантов осуществления настоящего изобретения, но настоящее изобретение можно осуществлять с различными модификациями без ограничения следующими вариантами осуществления.

[12] Настоящее изобретение относится к способу презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру. Циклический пептид содержит химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры, и этот способ включает замену химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, и, таким образом, слияние циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру.

В рамках изобретения циклический пептид можно презентировать на белке, содержащем петлевую структуру, с использованием белка в качестве каркаса при сохранении структуры и активности циклического пептида. Настоящее изобретение обладает преимуществами, заключающимися в том, что циклический пептид, презентруемый на белке, используемом в качестве каркаса, может иметь повышенную биологическую адаптируемость, и циклическому пептиду можно придавать функцию белка.

В настоящем изобретении циклический пептид презентруют на белке таким образом, чтобы заменять его частичную структуру петлевой структурой белка. Предпочтительно, частичная структура циклического пептида, заменяемая петлевой структурой, является структурой, проявляющей активность, более конкретно, физиологическую активность. С точки зрения структуры, частичная структура циклического пептида, подлежащая замене петлевой структурой, предпочтительно, выбрана из аминокислотных последовательностей, образующих внутримолекулярную циклическую структуру циклического пептида.

Настоящее изобретение может относиться к многофункциональному способу презентирования циклического пептида на протеиногенной структуре, т.е. на белке, без ограничения в отношении циклического пептида и белка.

[13] Циклический пептид содержит химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры таким образом, что он является пептидом, циклическая структура которого образована химически перекрестно сшитой

структурой. Настоящее изобретение в своей технической концепции отличается тем, что петлевую структуру белка используют вместо химически перекрестно сшитой структуры, другими словами, белок, рассматриваемый в качестве одной молекулы, используют вместо химически перекрестно сшитой структуры, до настоящего времени используемой для циклизации пептида.

Однако, сама первичная структура аминокислотной последовательности модифицированного белка, полученного посредством слияния циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру, не является циклизованной. В целом, структура, полученная из циклического пептида в модифицированном белке, по-видимому, отличается от исходной циклической структуры циклического пептида, но частично сохраняет трехмерную структуру пептида, и в то же время можно поддерживать активность циклического пептида.

В качестве преимущества настоящего изобретения можно подтвердить, что циклический пептид презентируют на белке, содержащем петлевую структуру, при косвенном сохранении структуры циклического пептида в модифицированном белке, полученном посредством слияния циклического пептида и белка, содержащего петлевую структуру, циклический пептид сохраняет свою исходную активность. Другими словами, в рамках изобретения можно предположить, что если модифицированный белок демонстрирует активность, которую имеет циклический пептид, циклический пептид презентирован на белке, содержащем петлевую структуру, при сохранении этой структуры. В рамках изобретения то, сохраняет ли циклический пептид свою структуру, также можно подтверждать, получая информацию о структуре модифицированного белка.

[14] Хотя белок, содержащий петлевую структуру, конкретно не ограничен, далее приведены его примеры. Далее в настоящем описании этот белок можно обозначать как "каркасный белок".

Примеры каркасного белка конкретно не ограничены, но включают иммуноглобулин, фибронектин, альбумин, гормон роста человека, щелочную фосфатазу, ретинолсвязывающий белок, утероглобин, фибриноген, фактор свертывания крови, трансферрин, фермент редактирования генома, содержащий Cas9, сопряженный с G-белком рецептор, цитокиновый рецептор, рецептор фактора роста, интегрин, кадгерин, рецептор трансферрина, иммунорецептор, белок вирусной оболочки и белок вирусного капсида.

Каркасный белок может являться частичным фрагментом белка, и его примеры включают частичные фрагменты белков, примеры которых приведены выше.

Каркасный белок может являться частичным фрагментом, содержащим петлевую структуру в качестве структуры части в полноразмерном белке, до тех пор, пока он содержит петлевую структуру.

Каркасный белок может являться белком, полученным посредством слияния с белком, содержащим петлевую структуру, или его частичным фрагментом, содержащим петлевую структуру, другим белком.

[15] Каркасный белок, примеры которого приведены выше, в своей вторичной структуре содержит петлевую структуру.

Петлевая структура конкретно не ограничена, и этот термин означает структуру, являющуюся областью полипептидной цепи, в которой α -спирали и/или β -листы соединены и имеют свернутую структуру.

В настоящем изобретении можно использовать петлевую структуру, присутствующую в каждом из каркасных белков, примеры которых приведены выше.

[16] В настоящем изобретении циклический пептид встраивают в петлевую структуру каркасного белка для слияния циклического пептида и каркасного белка. Этого слияния достигают, предпочтительно, посредством ковалентного связывания.

Петлевая структура, подлежащая ковалентному связыванию с циклическим пептидом, конкретно не ограничена, и она может являться петлевой структурой, присутствующей в каркасном белке, примеры которого приведены выше.

Не существует конкретных ограничений участка петлевой структуры, в который встраивают циклический пептид, и циклический пептид можно универсально встраивать в любое положение в петлевой структуре.

Термин "любой участок в петлевой структуре" означает, что два аминокислотных остатка для встраивания циклического пептида являются участками, выбранными из петлевой структуры.

Два аминокислотных остатка в петлевой структуре, предпочтительно, находятся в петлевой структуре, имеют расстояние между $C\alpha$ -атомами от 4 до 7 Å, и каждый из них по меньшей мере частично экспонирован на поверхности белка.

Т.к. расстояние между $C\alpha$ -атомами в двух аминокислотных остатках составляет от 4 до 7 Å, циклический пептид, слитый с каркасным белком, легко может сохранять свою исходную пептидную структуру и в модифицированном пептиде.

Расстояние между $C\alpha$ -атомами в двух аминокислотных остатках также можно подтверждать с помощью структурных данных о каркасном белке, стерическая структура которого известна. Даже если стерическая структура каркасного белка неизвестна, расстояние между двумя аминокислотными остатками можно оценивать с учетом модельной структуры, сконструированной с использованием структурной информации о белке, гомологичном каркасному белку (гомологе).

[17] Два аминокислотных остатка, выбранных для слияния с циклическим пептидом в петлевой структуре, могут являться аминокислотными остатками, смежными друг с другом в петлевой структуре, но, предпочтительно, они являются аминокислотными остатками, несмежными друг с другом. Термин "две аминокислоты, несмежные друг с другом" означает, что два аминокислотных остатка не следуют непосредственно друг за другом в первичной аминокислотной последовательности в петлевой структуре белка.

Например, в случае, если в кристаллической структуре белка выбирают два аминокислотных остатка, расположенных с расстоянием между $C\alpha$ -атомами от 4 до 7 Å,

два аминокислотных остатка каркасного белка, образующих петлевую структуру, могут содержать от 1 до 15 аминокислотных остатков между ними. Термин "содержит от 1 до 15 аминокислотных остатков между ними" означает, что два аминокислотных остатка содержат от 1 до 15 аминокислотных остатков между ними в первичной аминокислотной последовательности в петлевой структуре белка.

Эти 1-15 аминокислотных остатков между двумя аминокислотными остатками, предпочтительно, являются аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

[18] В способе презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру по настоящему изобретению, циклический пептид презентирован на белке, содержащем петлевую структуру и используемом в качестве каркаса. Предпочтительно, структуру белка и структуру циклического пептида можно поддерживать, заменяя петлевую структуру циклическим пептидом.

Выбирая из петлевой структуры два аминокислотных остатка, подлежащих связыванию с циклическим пептидом, так, чтобы достигать расстояния между C α -атомами двух аминокислотных остатков от 4 до 7 Å, можно поддерживать структуру, которую, по существу, имеет белок и сохранять активность циклического пептида.

[19] В настоящем изобретении термин "сохранять активность циклического пептида" означает следующее. Циклический пептид, предназначенный для слияния с белком, содержащим петлевую структуру, предпочтительно, известен как соединение, имеющее некоторую физиологическую активность, и даже после слияния циклического пептида, имеющего физиологическую активность, с белком циклический пептид сохраняет свою физиологическую активность.

В этом случае циклический пептид в качестве степени физиологической активности может иметь значение активности или значение ингибирования, отличающиеся до и после слияния с белком.

[20] В настоящем изобретении термин "замена химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру" означает следующее.

При замене двух аминокислотных остатков, образующих петлевую структуру, можно связывать структуру, иную, чем химически перекрестно сшитая структура циклического пептида, с двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, или частичную аминокислотную последовательность, полученную посредством удаления химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида и дальнейшего удаления одной или более аминокислот, образующих циклическую структуру циклического пептида, можно связывать с двумя аминокислотными остатками.

Связывание частичного аминокислотного остатка может являться связыванием частичной структуры, включающей структуру, демонстрирующую активность циклического пептида, более конкретно - его физиологическую активность.

Аминокислоты, образующие циклический пептид, могут являться, как показано

ниже, протеиногенными аминокислотами и/или непротеиногенными аминокислотами. Предпочтительно, циклический пептид частично содержит непротеиногенную аминокислоту. Если циклический пептид содержит непротеиногенную аминокислоту, в модифицированном белке, с которым циклический пептид подвергают слиянию, непротеиногенную аминокислоту, полученную из циклического пептида, предпочтительно, заменяют протеиногенной аминокислотой.

[21] При слиянии с каркасным белком протеиногенную аминокислоту, образующую циклический пептид, предпочтительно, подвергают слиянию в том виде, в каком она есть, но ее можно подвергать слиянию после замены другой протеиногенной аминокислотой.

Аминокислотная последовательность циклического пептида, подлежащего слиянию, может являться той же, что и аминокислотная последовательность исходного циклического пептида, или может являться последовательностью, полученной посредством замены, делеции или инсерции одной или более аминокислот.

[22] В настоящем изобретении термин "одна или более аминокислот" может означать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот или от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или одну аминокислоту.

[23] В настоящем изобретении при "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру", химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида можно заменять двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, с помощью линкерной последовательности.

Если химически перекрестно сшитую структуру заменяют с помощью линкерной последовательности, аминокислотную последовательность, полученную из петлевой структуры, линкерную последовательность и аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, в порядке упоминания подвергают слиянию с N-концевой стороной модифицированного белка, с которым подвергают слиянию циклический пептид, в то время как аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, линкерную последовательность и аминокислотную последовательность, полученную из петлевой структуры, в порядке упоминания подвергают слиянию с C-концевой стороной модифицированного белка.

Модифицированный белок может содержать линкерную последовательность и на N-концевой стороне, и на C-концевой стороне, но он может содержать линкерную последовательность на любой из N-концевой стороны и C-концевой стороны.

[24] Линкерная последовательность конкретно не ограничена, и ее примеры включают последовательности, состоящие из одного или более остатков серина, глицина и/или цистеина, более конкретно, последовательности, состоящие из от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или одного Ser, Gly и/или Cys. Предпочтительно, линкерная последовательность является последовательностью, состоящей из Ser и/или Gly.

[25] В настоящем изобретении при "замене химически перекрестно сшитой

структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру" химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида можно заменять двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, при этом включая аминокислотную последовательность, образующую петлевую структуру, иную, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру.

Когда замену осуществляют при включении аминокислотной последовательности, образующей петлевую структуру, иной, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру, N-концевую аминокислоту из двух аминокислот, образующих петлевую структуру, аминокислотную последовательность, полученную из петлевой структуры, линкерную последовательность, при желании, и аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, в порядке упоминания подвергают слиянию с N-концевой стороной модифицированного белка, с которым подвергают слиянию циклический пептид, в то время как аминокислотную последовательность, полученную из циклического пептида, линкерную последовательность, при желании, аминокислотную последовательность, полученную из петлевой структуры, и C-концевую аминокислоту из двух аминокислот, образующих петлевую структуру, в порядке упоминания подвергают слиянию с C-концевой стороной модифицированного белка.

Модифицированный белок на своей N-концевой стороне и C-концевой стороне может содержать аминокислотную последовательность, образующую петлевую структуру, иную, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру, или он может содержать на любой из своей N-концевой стороны или C-концевой стороны аминокислотную последовательность, образующую петлевую структуру, иную, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру.

Термин "аминокислотная последовательность, образующая петлевую структуру, иная, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру", предпочтительно, относится к множеству аминокислотных последовательностей, полученных из петлевой структуры, находящейся между двумя аминокислотами, образующими петлевую структуру, и они являются аминокислотными последовательностями, смежными с двумя аминокислотами, образующими петлевую структуру, и связанными с ними, соответственно.

[26] Ниже приведено более подробное описание.

В настоящем изобретении, если из двух аминокислотных остатков, присутствующих в каркасном белке и предназначенных для замены химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида, аминокислотный остаток, образующий петлевую структуру и находящийся на N-концевой стороне, представлен V_N , и аминокислотный остаток, образующий петлевую структуру и находящийся на C-концевой стороне, представлен V_C , петлевая структура циклического пептида включает структуру, представленную следующей формулой: $-V_N-(Xaa)_m-V_C-$ (в каждом случае, когда циклический пептид содержит петлевую структуру, каждый из Xaa независимо представляет собой произвольный аминокислотный остаток, и m означает произвольное

целое число 0 или более, предпочтительно - целое число от 1 до 15).

При "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру" аминокислоту, полученную из циклического пептида, можно связывать с V_N , можно связывать с V_N с помощью линкерной последовательности или можно связывать с $x1$ -ым Хаа1, при желании, с помощью линкерной последовательности, где $x1$ означает произвольное число, отсчитанное от V_N .

При "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру", аминокислоту, полученную из циклического пептида, можно связывать с V_C , можно связывать с V_C с помощью линкерной последовательности или можно связывать с $x2$ -ым Хаа1, при желании, с помощью линкерной последовательности, где $x2$ означает произвольное число, отсчитанное от V_C .

Если аминокислота, полученная из циклического пептида, связана с $x1$ -ым Хаа1, где $x1$ означает произвольное число, отсчитанное от V_N , с помощью линкерной последовательности, при желании, или если аминокислота, полученная из циклического пептида, связана с $x2$ -ым Хаа1, при желании, с помощью линкерной последовательности, где $x2$ означает произвольное число, отсчитанное от V_C , модифицированный белок, содержащий слитый с ним циклический пептид, содержит аминокислотную последовательность, образующую петлевую структуру, в дополнение к двум аминокислотам, образующим петлевую структуру.

[27] С другой стороны, если из двух аминокислотных остатков циклического пептида, образующих химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры, аминокислотный остаток, находящийся на N-концевой стороне, представлен C_N , и аминокислотный остаток на C-концевой стороне представлен C_C , циклический пептид имеет по меньшей мере первичную последовательность, представленную следующей формулой: $-C_N-(\text{Хаа}2)_n-C_C-$ (в каждом случае, когда может образовываться циклический пептид, каждый из Хаа2 независимо представляет собой произвольный аминокислотный остаток, и n означает произвольное целое число 2 или более). В дополнение к внутримолекулярной циклической структуре, циклический пептид может иметь линейную разветвленную цепь из циклической структуры. Что касается циклического пептида, C_N и C_C , представляющие собой два аминокислотных остатка, образуют химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры и, таким образом, получения циклического пептида.

При "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру", две аминокислоты, образующие петлевую структуру, или аминокислоту, иную, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру, можно связывать с C_N и/или C_C , при желании, с помощью линкерной последовательности.

Если C_N и/или C_C является непротеиногенной аминокислотой, ее можно заменять протеиногенной аминокислотой. Если C_N и/или C_C представляет собой Cys, C_N и/или C_C можно подвергать делеции. Если C_C является Cys, C_N можно заменять Cys и подвергать циклический пептид слиянию с ним.

При "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру", аминокислоту, полученную из циклического пептида, можно связывать с C_N , можно связывать с C_N с помощью линкерной последовательности или можно связывать с y_1 -ым Хаа2, где y_1 означает произвольное число, отсчитанное от C_N , при желании, с помощью линкерной последовательности. В частности, если C_N является непротеиногенной аминокислотой, после замены C_N протеиногенной аминокислотой, аминокислоту, полученную из циклического пептида, можно связывать с ней, при желании, с помощью линкерной последовательности.

При "замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру", аминокислоту, полученную из циклического пептида, можно связывать с C_C , можно связывать с C_C с помощью линкерной последовательности или можно связывать с y_2 -ым Хаа2, где y_2 означает произвольное число, отсчитанное от C_C , при желании, с помощью линкера. В частности, аминокислоту, полученную из циклического пептида, после делеции C_C можно связывать с первым Хаа2, отсчитанным от C_C , т.е. с Хаа2, подлежащим связыванию с C_C , при желании, с помощью линкерной последовательности.

Если аминокислоту, полученную из циклического пептида, связывают с y_1 -ым Хаа2, при желании, с помощью линкера, где y_1 означает произвольное число, отсчитанное от C_N , или если ее связывают с y_2 -ым Хаа2, при желании, с помощью линкера, где y_2 означает произвольное число, отсчитанное от C_C , модифицированный белок, содержащий слитый с ним циклический пептид, включает частичную последовательность циклического пептида.

[28] Термин "циклический пептид подвергают слиянию с белком, содержащим петлевую структуру" означает, что весь $-(\text{Хаа1})_m-$ петлевой структуры $-V_N-(\text{Хаа1})_m-V_C-$ или его $-(\text{Хаа1})_p-$ часть заменяют целым $C_N-(\text{Хаа2})_n-C_C$, образующим внутримолекулярную циклическую структуру циклического пептида, или его частью.

Структура после замены становится структурой, представленной $-V_N-(\text{Хаа1})_q-[C_N-(\text{Хаа2})_n-C_C]-(\text{Хаа1})_r-V_C-$. Эта структура не включает линкерную последовательность (r является целым числом не более m , $p+q+r$ представляет собой m , q и r являются целыми числами 0 или более, предпочтительно - целыми числами от 0 до 10). Если она содержит линкерную последовательность, то эта линкерная последовательность находится между связью $(\text{Хаа1})_q-[C_N-(\text{Хаа2})_n-C_C]$ и связью $[C_N-(\text{Хаа2})_n-C_C]-(\text{Хаа1})_r$.

Следует отметить, что " $[C_N-(\text{Хаа2})_n-C_C]$ " означает, что все или некоторые из аминокислотных последовательностей в последовательности подвергнуты слиянию. Предпочтительно, $C_N-(\text{Хаа2})_n$ подвергнута слиянию как частичная последовательность.

Если C_N и/или C_C являются непротеиногенными аминокислотами, их можно считать протеиногенными аминокислотами при слиянии.

Что касается аминокислотного остатка, представленного V_N и V_C , аминокислотный остаток в петлевой структуре можно использовать таким, как он есть, или, альтернативно, его можно заменять другим аминокислотным остатком. Что касается аминокислотного остатка, представленного C_N и C_C , аминокислотный остаток в циклическом пептиде можно использовать таким, как он есть, можно заменить другим аминокислотным остатком или подвергнуть делеции. Предпочтительно, C_N заменяют протеиногенной аминокислотой, а C_C подвергают делеции.

[29] В модифицированном белке, содержащем слитый с ним циклический пептид, количество аминокислот между N-концевой аминокислотой в аминокислотной последовательности, полученной из циклического пептида, и V_N , являющимся одним из двух аминокислотных остатков, образующих петлевую структуру и слитых на N-концевой стороне, и количество аминокислот между C-концевой аминокислотой в аминокислотной последовательности, полученной из циклического пептида, и V_C , являющимся одним из двух аминокислотных остатков, образующих петлевую структуру и слитых на C-концевой стороне, могут быть одинаковыми или разными.

Количество аминокислот между N-концевой аминокислотой в аминокислотной последовательности, полученной из циклического пептида и V_N , являющимся одним из двух аминокислотных остатков, образующих петлевую структуру и слитых на N-концевой стороне, может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или от 0 до 10, от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2, от 0 до 1 или 0 аминокислот.

Количество аминокислот между C-концевой аминокислотой в аминокислотной последовательности, полученной из циклического пептида, и V_C , являющимся одним из двух аминокислотных остатков, образующих петлевую структуру и слитых на C-концевой стороне, может составлять 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или от 0 до 10, от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, от 0 до 3, от 0 до 2, от 0 до 1 или 0 аминокислот.

[30] Циклический пептид может являться пептидом, получаемым общепринятым способом дисплея мРНК, способом TRAP или RaPID или способом фагового дисплея. Циклический пептид может являться пептидом, получаемым модифицированным способом.

Циклический пептид содержит, например, тиоэфирную связь или дисульфидную связь в качестве химически перекрестно сшитой структуры для получения внутримолекулярной циклической структуры.

Как правило, в циклическом пептиде, выбранном способом дисплея мРНК, такого как способ RaPID или способ TRAP, или способом фагового дисплея, структура, иная, чем химически перекрестно сшитая структура, для получения внутримолекулярной циклической структуре, такая как тиоэфирная связь или дисульфидная связь, обычно является активным участком, имеющим физиологическую активность.

Заменяя тиоэфирную связь или дисульфидную связь циклического пептида связью

с белком, содержащим петлевую структуру, заданной петлевой структуре заданного белка можно придавать высокую специфичность и аффинность циклического пептида, как правило, способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID или способ TRAP, или способом фагового дисплея. Хотя это конкретно и не ограничено, адаптируемого слияния циклического пептида можно достигать посредством слияния циклического пептида, содержащего тиоэфирную связь или дисульфидную связь, в виде внутримолекулярной циклической структуры.

[31] Циклический пептид конкретно не ограничен и может являться природным циклическим пептидом или неприродным циклическим пептидом.

Если на белке презентируют природный циклический пептид, можно использовать любую связь для связывания аминокислотных остатков друг с другом, т.к. их можно рассматривать в качестве химически перекрестно сшитой структуры для получения внутримолекулярной циклической структуры. В качестве химически перекрестно сшитой структуры для слияния с белком, предпочтительно, используют Связи между аминокислотными остатками в области, иной, чем область, считающаяся активным центром в природном циклическом пептиде.

[32] Циклический пептид является пептидом, содержащим в своей молекуле по меньшей мере циклическую структуру, состоящую из четырех или более аминокислотных остатков. Циклическая структура циклического пептида, состоящая из четырех или более аминокислотных остатков, является замкнутой структурой, образующейся в молекуле посредством связывания, напрямую, через линкер или т.п., двух аминокислотных остатков линейного пептида, разделенных двумя или более аминокислотами.

Термин "два аминокислотных остатка, разделенных двумя или более аминокислотами" означает, что два аминокислотных остатка содержат по меньшей мере два аминокислотных остатка между собой. Два аминокислотных остатка связаны друг с другом, но при этом содержат две или более аминокислот между собой.

[33] Замкнутая структура в циклической структуре конкретно не ограничена, но образована с помощью ковалентной связи между двумя аминокислотами.

Примеры ковалентной связи между двумя аминокислотами включают дисульфидную связь, пептидную связь, алкильную связь, алкенильную связь, сложноэфирную связь, сложную тиоэфирную связь, простую эфирную связь, простую тиоэфирную связь, фосфитную эфирную связь, азо-связь, связь C-S-C, связь C-N-C, связь C=N-C, амидную связь, лактамный мостик, карбамоиловую связь, карбамидную связь, тиокарбамидную связь, аминную связь и тиоамидную связь.

Если две аминокислоты связаны друг с другом через свою основную цепь, замкнутая структура образуется с помощью пептидной связи, но между двумя аминокислотами ковалентная связь может образовываться посредством связывания между соответствующими боковыми цепями двух аминокислот, связывания между их боковой цепью и основной цепью или т.п.

[34] Циклическая структура не ограничена структурой, образованной посредством

связывания между N-концевой аминокислотой и C-концевой аминокислотой линейного пептида, но она может образовываться посредством связывания между концевой аминокислотой и неконцевой аминокислотой или связывания между неконцевыми аминокислотами. Если одна из аминокислот, связывающихся с образованием циклической структуры, является концевой аминокислотой, а другая аминокислота является неконцевой аминокислотой, получаемый циклический пептид содержит циклическую структуру, содержащую в качестве линейной разветвленной цепи из циклической структуры линейный пептид, присоединенный к ней подобно хвосту.

[35] Аминокислота, образующая циклическую структуру, может являться протеиногенной аминокислотой, искусственной мутантной аминокислотой или их производным. Примеры включают протеиногенные L-аминокислоты и химически синтезированные соединения, имеющие свойства, известные в этой области в качестве характеристик аминокислот.

Протеиногенными аминокислотами являются обозначенные известным в этой области трехбуквенным кодом Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr и Val.

Термин "непротеиногенные аминокислоты" означает природные или неприродные аминокислоты, иные, чем протеиногенные аминокислоты.

Примеры неприродных аминокислот включают α,α -дизамещенные аминокислоты (такие как α -метилаланин), N-алкил- α -аминокислоты, D-аминокислоты, β -аминокислоты и α -гидроксикислоты, каждая из которых имеет структуру основной цепи, отличающуюся от структуры в природных аминокислотах; аминокислоты (такие как норлейцин и гомогистидин), имеющую структуру боковой цепи, отличающуюся от структуры в природных аминокислотах; аминокислоты (такие как "гомо"-аминокислоты, гомофенилаланин и гомогистидин), содержащие дополнительную метиленовую группу в своей боковой цепи; и аминокислоты (такие как цистеиновая кислота), полученные посредством замещения функциональной группы карбоновой кислоты в боковой цепи группой сульфоновой кислоты. Конкретные примеры неприродных аминокислот включают аминокислоты, описанные в WO2015/030014.

[36] Количество аминокислот, образующих циклическую структуру, конкретно не ограничено до тех пор, пока оно составляет 4 или более. Например, оно может составлять 5 или более, 8 или более или 10 или более и 30 или менее, 25 или менее, 20 или менее или 15 или менее.

Количество аминокислот, образующих циклическую структуру, предпочтительно, составляет от 4 или более до 30 или менее. Используя диапазон от 4 или более до 30 или менее, можно устанавливать количество аминокислот, образующих циклическую структуру, 5 или более, 8 или более или 10 или более и 30 или менее, 25 или менее, 20 или менее или 15 или менее.

Можно устанавливать количество аминокислот, образующих циклическую структуру, от 8 или более до 20 или менее, от 10 или более до 20 или менее или от 10 или

более до 15 или менее.

[37] Циклический пептид, предназначенный для использования в настоящем изобретении, является циклическим пептидом, который можно получать с помощью известной технологии пептидного синтеза.

Примеры способа получения циклического пептида включают способ химического синтеза, такой как жидкофазный способ, твердофазный способ или гибридный способ с использованием жидкофазного способа и твердофазного способа в комбинации; способ генетической рекомбинации и способ синтеза посредством трансляции в бесклеточной системе трансляции.

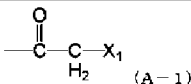
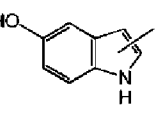
[38] Циклический пептид, предпочтительно, является пептидом, который можно получать, предпочтительно, способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID, или способ TRAP, или способом фагового дисплея.

[39] Способом RaPID можно получать, например, циклический пептид, в котором циклизована аминокислота, содержащая функциональную группу 1, и аминокислота, содержащая функциональную группу 2, соответственно, каждая из которых представлена ниже в таблице 1.

Функциональную группу 1 или 2 можно располагать на N-концевой стороне; их можно располагать на N-конце и C-конце, соответственно; одна из них может являть концевой аминокислотой, а другая может являться неконцевой аминокислотой; или обе могут являться неконцевыми аминокислотами.

Связь, образуемую между функциональной группой 1 и функциональной группой 2, можно считать химически перекрестно сшитой структурой для получения внутримолекулярной циклической структуры в циклическом пептиде.

[40] Таблица 1:

	Функциональная группа 1	Функциональная группа 2
(A)		HS— (A-2)
(B)	—C≡C—H (B-1)	N ₃ — (B-2)
(C)	—Ar—CH ₂ NH ₂ (C-1)	
(D)	—C≡C—CH ₂ —X ₁ (D-1)	HS— (D-2)
(E)	—Ar—CH ₂ —X ₁ (E-1)	HS— (E-2)

В приведенных выше формулах X₁ представляет собой уходящую группу, например, атом галогена, такого как Cl, Br или I, и Ar представляет собой замещенное или незамещенное ароматическое кольцо.

[41] Способом фагового дисплея можно получать циклический пептид, в котором Cys и Cys связаны друг с другом с образованием цикла, таким образом, что можно получать циклический пептид, содержащий дисульфидную связь между -SH в качестве функциональной группы 1 и HS- в качестве функциональной группы 2.

[42] В качестве аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-1) можно

использовать, например, хлорацетилованную аминокислоту. Примеры хлорацетилованной аминокислоты включают N-хлорацетил-L-аланин, N-хлорацетил-L-фенилаланин, N-хлорацетил-L-тирозин, N-хлорацетил-L-триптофан, N-3-(2-хлорацетамидо)бензоил-L-фенилаланин, N-3-(2-хлорацетамидо)бензоил-L-тирозин, N-3-(2-хлорацетамидо)бензоил-L-триптофан, β -N-хлорацетил-L-диаминопропионовую кислоту, γ -N-хлорацетил-L-диаминомасляную кислоту, σ -N-хлорацетил-L-орнитин, ϵ -N-хлорацетил-L-лизин и соответствующие D-аминокислотные производные.

В качестве аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-1), предпочтительно, используют N-хлорацетил-L-триптофан и N-хлорацетил-L-тирозин, при этом их D-форма является более предпочтительной.

В настоящем описании аминокислоту иногда описывают, четко указывая, что она находится в L-форме, но она может находиться в L-форме или D-форме. Она также может представлять собой смесь L-формы и D-формы в любом соотношении. Даже если аминокислоту описывают, четко не указывая, находится ли она в L-форме или D-форме, она может находиться в L-форме или D-форме или являться смесью L-формы и D-формы в любом соотношении.

[43] Примеры аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-2), включают цистеин, гомоцистеин, меркаптонорвалин, меркаптонорлейцин, 2-амино-7-меркаптогептановую кислоту и 2-амино-8-меркаптооктановую кислоту.

В качестве аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-1), предпочтительно, используют цистеин.

[44] Способ циклизации с использованием аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-1), и аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-2), можно осуществлять, как описано, например, в Kawakami, T. et al., *Nature Chemical Biology* 5, 888-890 (2009); Yamagishi, Y. et al., *ChemBioChem* 10, 1469-1472 (2009); Sako, Y. et al., *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008); Goto, Y. et al., *ACS Chemical Biology* 3, 120-129 (2008); Kawakami T. et al., *Chemistry & Biology* 15, 32-42 (2008) и WO2008/117833.

[45] В качестве аминокислоты, содержащей функциональную группу (B-1), можно использовать, например, пропаргилглицин, гомопротаргилглицин, 2-амино-6-гептиновую кислоту, 2-амино-7-октиновую кислоту и 2-амино-8-нониновую кислоту.

Альтернативно, можно использовать 4-пентиноилированную или 5-гексиноилированную аминокислоту.

Примеры 4-пентиноилированной аминокислоты включают N-(4-пентеноил)-L-аланин, N-(4-пентеноил)-L-фенилаланин, N-(4-пентеноил)-L-тирозин, N-(4-пентеноил)-L-триптофан, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-фенилаланин, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-тирозин, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-триптофан, β -N-(4-пентеноил)-L-диаминопропионовую кислоту, γ -N-(4-пентеноил)-L-диаминомасляную кислоту, σ -N-(4-пентеноил)-L-орнитин, ϵ -N-(4-пентеноил)-L-лизин и их соответствующие D-аминокислотные производные.

Примеры 5-гексиноилированной аминокислоты включают аминокислоты, полученные посредством замены 4-пентиноиловой группы в соединениях, примеры которых приведены как 4-пентиноилированные аминокислоты, 5-гексиноильной группой.

[46] В качестве аминокислоты, содержащей функциональную группу (B-2), можно использовать, например, азидоаланин, 2-амино-4-азидобутановую кислоту, азидонорвалин, азидонорлейцин, 2-амино-7-азидогептановую кислоту и 2-амино-8-азидооктановую кислоту.

Альтернативно, также можно использовать азидоацетилованную или 3-азидопентаноилированную аминокислоту.

Примеры азидоацетилованной аминокислотой включают N-азидоацетил-L-аланин, N-азидоацетил-L-фенилаланин, N-азидоацетил-L-тирозин, N-азидоацетил-L-триптофан, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-фенилаланин, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-тирозин, N-3-(4-пентиноиламидо)бензоил-L-триптофан, β -N-азидоацетил-L-диаминопропионовую кислоту, γ -N-азидоацетил-L-диаминомасляную кислоту, σ -N-азидоацетил-L-орнитин, ϵ -N-азидоацетил-L-лизин и их соответствующие D-аминокислотные производные.

Примеры 3-азидопентаноилированной аминокислоты включают аминокислоты, полученные посредством замены азидоацетильной группы в соединениях, примеры которых приведены в качестве азидоацетилованных аминокислот, 3-азидопентаноиловой группой.

[47] Примеры способа циклизации с использованием аминокислоты, содержащей функциональную группу (B-1), и аминокислоты, содержащей функциональную группу (B-2), включают способ, описанный в Sako, Y. et al., *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008) и в WO2008/117833.

[48] Примеры аминокислоты, содержащей функциональную группу (C-1), включают N-(4-аминометил-бензоил)-фенилаланин (AMBF) и 3-аминометилтирозин.

Примеры аминокислоты, содержащей функциональную группу (C-2), включают 5-гидрокситриптофан (WОН).

Примеры способа циклизации с использованием аминокислоты, содержащей функциональную группу (C-1), и аминокислоты, содержащей функциональную группу (C-2), включают способ, описанный в Yamagishi, Y. et al., *ChemBioChem* 10, 1469-1472 (2009) и в WO2008/117833.

[49] Примеры аминокислоты, содержащей функциональную группу (D-1), включают 2-амино-6-хлоро-гексиновую кислоту, 2-амино-7-хлоро-гептиновую кислоту и 2-амино-8-хлоро-октиновую кислоту.

Примеры аминокислоты, содержащей функциональную группу (D-2), включают цистеин, гомоцистеин, меркаптонорвалин, меркаптонорлейцин, 2-амино-7-меркаптогептановую кислоту и 2-амино-8-меркаптооктановую кислоту.

Примеры способа циклизации с использованием аминокислоты, содержащей функциональную группу (D-1), и аминокислоты, содержащей функциональную группу

(D-2), включают способ, описанный в WO2012/074129.

[50] Примеры аминокислоты (E-1) включают N-3-хлорметилбензоил-L-фенилаланин, N-3-хлорметилбензоил-L-тирозин, N-3-хлорметилбензоил-L-триптофан и их соответствующие D-аминокислотные производные.

Примеры аминокислоты (E-2) включают цистеин, гомоцистеин, меркаптонорвалин, меркаптонорлейцин, 2-амино-7-меркаптогептановую кислоту и 2-амино-8-меркаптооктановую кислоту.

Способ циклизации аминокислоты содержащей функциональную группу (E-1), и аминокислоты, содержащей функциональную группу (E-2), можно осуществлять с учетом, например, способа циклизации с использованием (A-1) и (A-2) или способа циклизации с использованием (D-1) и (D-2).

[51] Образующая кольцо аминокислота, предпочтительно, представляет собой комбинацию аминокислоты, содержащей функциональную группу (A-1), с аминокислотой, содержащей функциональную группу (A-2), более предпочтительно - комбинацию N-ацетилтриптофана, полученного посредством замены H уходящей группой, с цистеином, еще более предпочтительно - комбинацию N-галогенацетил-D-тирозина или N-галогенацетил-D-триптофан, а предпочтительно, N-хлорацетил-D-тирозина или N-хлорацетил-D-триптофана, с цистеином.

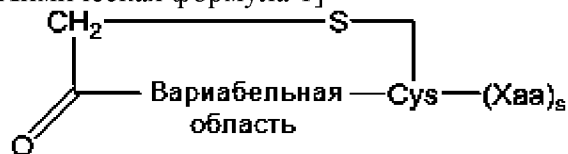
[52] В настоящем изобретении предпочтительно использовать циклический пептид, полученный способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID или TRAP, или способом фагового дисплея, и имеющий физиологическую активность в отношении заданной связывающей молекулы.

Предпочтительно осуществлять слияние связи, образованной между функциональной группой 1 и функциональной группой 2 в пептиде, полученном, предпочтительно, способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID или способ TRAP, или способом фагового дисплея, в качестве химически перекрестно сшитой структуры для получения внутримолекулярной циклической структуры, с белком, содержащим петлевую структуру.

[53] Циклический пептид, предназначенный для использования в настоящем изобретении, далее в настоящем описании будет описан с использованием в качестве примера циклического пептида, полученного способом RaPID.

В настоящем изобретении циклический пептид, полученный способом RaPID, конкретно не ограничен, но в качестве примера можно привести циклический пептид, представленный следующей формулой.

[Химическая формула 1]



Циклический пептид, представленный указанной выше формулой, является

примером, и он имеет структуру, в качестве функциональной группы 1 и функциональной группы 2 содержащую группы, указанные в (А) в таблице 1.

В формуле S означает атом серы, полученный из тиоловой группы Cys, Хаа означает произвольную аминокислоту, и s означает произвольное целое число 0 или более. Термин "вариабельная область" означает аминокислотную последовательность, иную, чем Cys, образующую циклическую аминокислоту. N-концевая аминокислота вариабельной области, предпочтительно, является аминокислотой, содержащей функциональную группу (А-1).

Аминокислотная последовательность вариабельной области представляет собой частичную аминокислотную последовательность в циклическом пептиде, полученном способом RaPID, и она может являться любой аминокислотной последовательностью до тех пор, пока она образует циклический пептид.

[54] Если пептид, представленный приведенной выше формулой, используют в качестве циклического пептида, N-концевой аминокислотный остаток вариабельной области является C_N , а Cys является C_C .

Если C_N , например, является N-галогенацетил-D-триптофаном, являющимся непотеиногенной аминокислотой, его, предпочтительно, заменяют L-триптофаном, являющимся протеиногенной аминокислотой, в то время как если он является, например, N-хлорацетил-D-тирозином, являющимся непотеиногенной аминокислотой, его, предпочтительно, заменяют L-тирозином, являющимся протеиногенной аминокислотой. Затем циклический пептид подвергают слиянию. Альтернативно, C_N можно заменять Cys, являющимся протеиногенной аминокислотой. Если C_C является, например, Cys, циклический пептид, предпочтительно, подвергают слиянию после делеции C_C . Если C_C является Cys, и Cys, являющийся C_C , также подвергают слиянию, слияние можно осуществлять после замены C_N Cys. Если циклический пептид, представленный приведенной выше формулой, подвергают слиянию, при желании, D-аминокислоту заменяют L-аминокислотой, но, предпочтительно, аминокислотную последовательность вариабельной области как частичную аминокислотную последовательность из аминокислотной последовательности, образующей циклическую структуру циклического пептида, подвергают слиянию с модифицированным белком, содержащим слитый с ним циклический пептид. В рамках изобретения следует понимать, что часть аминокислотной последовательности вариабельной области, например, аминокислотную последовательность вариабельной области в условиях, когда непотеиногенную аминокислоту C_N заменяют протеиногенной аминокислотой, подвергают слиянию с модифицированным белком, содержащим слитый с ним циклический пептид. Вариабельная область и Cys C_C также можно подвергать слиянию друг с другом.

[55] Для слияния циклического пептида, предпочтительно, полученного способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID или способ TRAP, или способом фагового дисплея, с белком, содержащим петлевую структуру, предпочтительно осуществлять модификацию, как описано ниже.

(1) Аминокислотные остатки, включенные в химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры, в способе дисплея мРНК, таком как способ RaPID или TRAP, или способе фагового дисплея, заменяют или удаляют, и аминокислотный остаток, полученный из циклического пептида, можно подвергать слиянию с аминокислотным остатком, полученным из петлевой структуры.

Более конкретно, в циклическом пептиде, полученном способом RaPID, аминокислотный остаток, содержащий функциональную группу 1, заменяют протеиногенной аминокислотой и аминокислотный остаток, содержащий функциональную группу 2, подвергают делеции, затем осуществляя слияние с петлевой структурой. В качестве аминокислотного остатка, содержащего функциональную группу 1, иногда используют непротеиногенную аминокислоту, такую как D-аминокислота.

В циклическом пептиде, полученном способом фагового дисплея, можно удалять остаток Cys, образующий связь S-S в качестве химически перекрестно сшитой структуры, затем осуществляя слияние с петлевой структурой.

Более конкретно, в способе RaPID, если структуру (A-1) используют для функциональной группы 1, в качестве аминокислоты, содержащей структуру (A-1), как правило, используют ClAc-D-Trp или ClAc-D-Tyr, но в модифицированном белке аминокислотный остаток, предпочтительно, заменяют L-Trp или L-Tyr. Альтернативно, ClAc-D-Trp или ClAc-D-Tyr можно подвергать делеции.

В качестве аминокислоты, содержащей структуру (A-2), зачастую используют Cys, но остаток Cys можно подвергать делеции из модифицированного белка.

(2) В (1) аминокислотную последовательность, не содержащую циклический пептид, но состоящую из аминокислотного остатка, такого как Ser, Gly и Cys, используют в качестве линкерной последовательности между циклическим пептидом и петлевой структурой, и аминокислотный остаток, полученный из циклического пептида, можно подвергать слиянию с аминокислотным остатком, полученным из петлевой структуры, одновременно встраивая между ними линкерную последовательность.

(3) В модифицированном белке, полученном посредством превращения аминокислотного остатка, включенного в химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры, в L-Cys и слияния циклического пептида с петлевой структурой, перекрестно сшитую структуру можно получать посредством образования дисульфидной связи, в то же время аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотного остатка, такого как Ser и Gly, используют в качестве линкерной последовательности между циклическим пептидом и петлевой структурой и встраивают между аминокислотным остатком, полученным из циклического пептида, и аминокислотным остатком, полученным из петлевой структуры, для их слияния.

Количество аминокислотных остатков, образующих линкерную последовательность, может представлять собой один или более, и количество аминокислотных остатков конкретно не ограничено.

[56] В настоящем изобретении способ презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, включает слияние циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру. Циклический пептид можно подвергать слиянию с белком, содержащим петлевую структуру, с помощью типичной технологии генетической инженерии.

Более конкретно, настоящее изобретение в качестве способа слияния циклического пептида с белком относится к способу слияния циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру, и, таким образом, получения модифицированного белка, содержащего циклический пептид, презентированный на белке.

Способ слияния циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру, и, таким образом, получения модифицированного белка, содержащего циклический пептид, презентированный на белке, включает:

использование в качестве циклического пептида циклического пептида, содержащего химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры,

выбор из аминокислотной последовательности циклического пептида частичной аминокислотной последовательности, предназначенной для презентирования на белке, и выбор последовательности оснований, соответствующей частичной аминокислотной последовательности,

выбор последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным последовательностям, образующим петлевую структуру белка, содержащего петлевую структуру, соответственно, удаление основания, находящегося между выбранными последовательностями оснований, при необходимости, и получение нуклеиновой кислоты, содержащей встроенную последовательность оснований, соответствующую частичной аминокислотной последовательности циклического пептида, и

трансляцию нуклеиновой кислоты.

[57] В качестве циклического пептида предпочтительным является циклический пептид, выбранный способом дисплея мРНК, таким как способ RaPID или TRAP, или способом фагового дисплея, при этом пептид, выбранный способом дисплея мРНК, является более предпочтительным. Последовательность оснований для частичной аминокислотной последовательности циклического пептида, предназначенную для инсерции, легко можно получать способом дисплея мРНК или т.п.

[58] Способ выбора последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным остаткам, образующим петлевую структуру белка, содержащего петлевую структуру, соответственно, и удаления основания, находящегося между выбранными последовательностями оснований, при необходимости, или способ получения нуклеиновой кислоты, содержащей встроенную последовательность оснований, соответствующую частичной аминокислотной последовательности циклического пептида, конкретно не ограничен, и его можно осуществлять общеизвестным способом.

Способ трансляции нуклеиновой кислоты, полученной таким образом, хорошо известен в области техники, к которой относится настоящее изобретение, таким образом, что трансляцию нуклеиновой кислоты, при необходимости, можно осуществлять таким хорошо известным способом.

[59] При выборе последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным остаткам, образующим петлевую структуру белка, содержащего петлевую структуру, два аминокислотных остатка, которые станут каркасом для слияния с циклическим пептидом, выбраны из аминокислотных последовательностей, образующих петлевую структуру, в аминокислотных последовательностях белка, содержащего петлевую структуру (могут являться аминокислотными последовательностями частичного сегмента белка или аминокислотными последовательностями слитого белка).

Два аминокислотных остатка можно выбирать с использованием структурных данных о каркасном белке или с использованием модельной структуры, сконструированной с учетом структурной информации о белке (гомологе), аналогичном ей, даже если стерическая структура каркасного белка неизвестна.

При выборе двух аминокислотных остатков, если выбирают каркасный белок, содержащий множество петлевых структур, предпочтительно выбирать петлевую структуру, с которой подвергают слиянию циклический пептид, и выбирать из петлевой структуры два аминокислотных остатка, имеющих расстояние между $C\alpha$ -атомами от 4 до 7 Å.

При выборе двух аминокислотных остатков предпочтительно выбирать два аминокислотных остатка, отделенных друг от друга 1-15 аминокислотными остатками, и более предпочтительно выбирать два аминокислотных остатка, имеющих расстояние между $C\alpha$ -атомами от 4 до 7 Å и отделенных друг от друга в 1-15 аминокислотных остатков.

В двух аминокислотных остатках, выбранных из каркасного белка, аминокислотный остаток на N-концевой стороне представлен V_N , и аминокислотный остаток на C-концевой стороне представлен V_C , каждый из которых получают из исходного каркасного белка.

Аминокислотную последовательность на C-концевой стороне, предназначенную для связывания с V_N , можно использовать для связывания с циклическим пептидом и аминокислотную последовательность на N-концевой стороне, предназначенную для связывания с V_C , можно использовать для связывания с циклическим пептидом.

[60] После выбора аминокислотных остатков, предназначенных для связывания с циклическим пептидом, можно выбирать добавление линкерной последовательности.

[61] При выборе циклического пептида, предназначенного для слияния с каркасным белком, предпочтительно, выбирают циклический пептид, о котором известно, что он имеет некоторую физиологическую активность, или циклический пептид с подтвержденной физиологической активностью. Аминокислотную последовательность циклического пептида, при необходимости, можно подтверждать общепринятым

способом.

Аминокислотную последовательность циклического пептида, предназначенную для слияния, выбирают с учетом информации о первичной аминокислотной последовательности, доступной посредством идентификации связи, являющейся химически перекрестно сшитой структурой циклического пептида, и разрыва связи.

[62] Заранее определенный модифицированный белок можно получать посредством определения последовательности оснований, необходимой для трансляции белка, с учетом аминокислотной последовательности, выбранной таким образом, и осуществления трансляции.

[63] Модифицированный белок, полученный способом по настоящему изобретению с использованием белка, содержащего петлевую структуру, в качестве каркаса и презентирования циклического пептида на белке, можно использовать в качестве реагента, лекарственного средства или т.п. с учетом активности циклического пептида, т.к. циклический пептид презентируют при одновременном сохранении его структуры и активности.

Модифицированный белок, содержащий циклический пептид, слитый с ним, проявляет активность самого белка и активность циклического пептида таким образом, что его можно использовать в качестве модифицированного белка, имеющего две разные активности или активности одного типа.

[64] В рамках изобретения один циклический пептид можно подвергать слиянию с одной или более петлевыми структурами белка, содержащего одну или более петлевых структур, или два или более циклических пептида можно подвергать слиянию с соответствующим образом отличающимися петлевыми структурами белка, содержащего множество петлевых структур.

Если слиянию подвергают два или более циклических пептида, они могут являться циклическими пептидами, имеющими одну и ту же аминокислотную последовательность, или два или более циклических пептида могут являться циклическими пептидами, имеющими соответствующим образом отличающиеся аминокислотные последовательности.

ПРИМЕРЫ

[65] Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет конкретно описано с помощью примеров, но настоящее изобретение не ограничено следующими примерами.

[66] Плексин В1 человека, рецептор Met человека, рецептор EGF человека и рецептор TrkB человека, предназначенные для использования в качестве связывающей молекулы, подвергали воздействию системы RaPID с учетом описанного в WO2011/049157 и опубликованной патентной заявке Японии № 2013-46637, и получали от 1 до 3 циклических пептидов, специфически связывающихся с каждым из них. Структура циклических пептидов показана на фиг. 1.

[67] На фиг. 1 N-концевая аминокислота аминокислотной последовательности переменной области и Cys (показанный в формуле) константной области,

соответственно, соответствуют аминокислотным остаткам C_N и C_C , используемым для последующего связывания. D-аминокислоты, указанные, соответственно, строчными буквами w и y в качестве N-концевых аминокислот циклических пептидов, встраивают в слитый белок после замены L-аминокислотой или делеции.

[68] Циклические пептиды, указанные на фиг. 1, P6 и P7, являются циклическими пептидами, описанными в Cell Chem. Biol, 2016, 23, 1341-1350, и каждый из них имеет связывающую активность в отношении плексина В человека. Циклический пептид mP6-9 получают посредством частичной модификации аминокислотной последовательности P6, и, аналогично P6, он связывается с плексином В1 человека. Циклические пептиды P6 и mP6-9 связываются с плексином В1 человека для аллостерического ингибирования связывания семафорина 4D с плексином В1 человека. В результате они имеют ингибиторную активность в отношении морфологического изменения клеток, вызванного стимуляцией семафорина 4D (Cell Chem. Biol, 2016, 23, 1341-1350).

[69] Каждый из циклических пептидов aMD4, aMD5 и aML5, описанных в Nature Commun, 2015, 6, 6373, имеет связывающую активность в отношении рецептора Met человека. Показано, что эти пептиды не только активируют рецептор Met человека, но после димеризации посредством перекрестной сшивки они активируют рецептор Met человека и приобретают агонистическую активность.

[70] Циклические пептиды A6-2f и trkD5, соответственно, связываются с рецептором EGF человека и рецептором TrkB человека с наномолярным уровнем аффинности.

[71] [Пример 1] Слияние десятого домена повтора типа III фибронектина и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой восьми описанных выше физиологически активных циклических пептидов, десятый домен повтора типа III (далее в настоящем описании обозначаемый как "Fn10") фибронектина человека выбирали в качестве белка, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка, и два аминокислотных остатка Val1490 (соответствующий B_N) и Ser1499 (соответствующий B_C), имеющих расстояние между $C\alpha$ -атомами 4,1 Å, выбирали в качестве связывающих остатков из петлевой части, расположенной между шестым и седьмым β -тяжами стерической структуры белка. Стерическая структура домена показана на фиг. 2.

[72] Слитый белок конструируют посредством замены части восьми аминокислотных остатков, расположенных между двумя аминокислотными остатками B_N и B_C , выбранными в Fn10, аминокислотной последовательностью варибельной области циклического пептида, показанной на фиг. 1 и содержащей на обеих сторонах произвольную линкерную аминокислоту, добавленную при необходимости (аминокислотную последовательность варибельной области слитого циклического пептида конструируют посредством замены непротеиногенной аминокислоты

вариабельной области циклического пептида, указанной как w или y, протеиногенной аминокислотой W или Y, соответственно. Это будет в равной степени использовано далее в настоящем описании. Только при слиянии P7 N-концевой аминокислотный остаток w в вариабельной области P7 заменяют Cys, и этот Cys конструируют вместе с Cys, соответствующим C_C). Аминокислотная последовательность петлевой части после слияния с циклическим пептидом в сконструированном таким образом слитом белке показана на фиг. 3.

[73] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

ДНК, кодирующую сигнальную последовательность пролактина человека, ДНК, кодирующую область аминокислотных остатков 1418-1509 фибронектина человека, и ДНК, кодирующую Fc-область IgG1 человека, соединяли для получения конструкции слитого белка Fn10-Fc. Затем полученную конструкцию встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific).

[74] Используя экспрессирующий вектор Fn10-Fc, получали экспрессирующий вектор, заменяя восемь аминокислотных остатков петлевой области, расположенной между Val1490 и Ser1499 в области фибронектина, каждой из последовательностей вставок, показанных на фиг. 3. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения соответствующих конструкций различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Слитые белки с циклическим пептидом, полученные таким образом, называли Fn10(название циклического пептида)-Fc, например, Fn10(P6)-Fc.

[75] Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific) высевали для получения 3×10^6 клеток/мл на 3 мл среды Expi293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific). Затем общепринятым способом 3 мкг экспрессирующего вектора Fn10-Fc (или его мутанта) встраивали в клетки Expi293F с использованием реагента ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific). После встраивания клетки культивировали при встряхивании в течение 18 часов при 125 об./мин., 37°C и 8% CO₂. Затем добавляли 15 мкл усилителя трансфекции 1 ExpiFectamine 293 и 150 мкл усилителя трансфекции 2 ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific) и полученную смесь культивировали при встряхивании в течение 3 дней при 125 об./мин., 37°C и 8%CO₂. Затем собирали полученный супернатант.

[76] После добавления 30 мкл протеин А-сефарозы (Thermo Fisher Scientific) к 0,3 мл полученного таким образом супернатанта полученную смесь перемешивали посредством вращения в течение 2 часов. Сефарозу осаждали посредством центрифугирования и удаляли супернатант. Затем сефарозу три раза промывали 1 мл забуференного Tris физиологического раствора (TBS, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Затем добавляли 20 мкл буфера для образца с SDS и полученную смесь нагревали при 95°C в течение 2 минут для элюции образца. Элюированный таким образом образец (5 мкл) подвергали электрофорезу в восстановительных условиях, а затем окрашивали кумасси бриллиантовым синим.

[77] Результаты электрофореза показаны на фиг. 4. На фиг. 4 номер образца указан

числом в кружке. Обнаруживали полосу Fn10-Fc (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (37,5 кДа), и все слитые белки с циклическим пептидом (образцы №№ 2-9) демонстрировали молекулярную массу, немного ее превышающую, что соответствует тому, что общая длина их аминокислотных последовательностей на 12-20 остатков больше. Подтверждали, что слитые белки с циклическим пептидом экспрессировались и секретировались клетками Expi293F в количестве, сравнимом с таковым у Fn10-Fc без встроенного пептида.

[78] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Осуществляли эксперимент по связыванию с осаждением для исследования того, сохраняет ли Fn10-Fc, содержащий различные слитые с ним циклические пептиды, свою связывающую способность в отношении связывающих молекул, которую циклические пептиды имели до слияния. Способом, описанным в Protein Exp. Purification, 2014, 95, 240-247, получали соответствующие конструкции, кодирующие слитые белки, содержащие РА-метку (Wako Pure Chemical Industries), добавленную на С-конец внеклеточной области четырех связывающих молекул (каждая из которых является однопроходным мембранным рецептором), и каждую из полученных конструкций встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific). После транзиторной экспрессии в клетках Expi293F описанным выше способом с использованием вектора получали соответствующие супернатанты культур, содержащие плексин В1-РА, Met-РА, EGFR-РА и TrkB-РА, являвшиеся растворимыми фрагментами рецепторов.

[79] К 0,5 мл супернатанта культуры, содержащего внеклеточную область рецептора с РА-меткой, добавляли 30 мкл сефарозы (Wako Pure Chemical Industries), на которой иммобилизовали NZ-1, антитело против РА-метки, и полученную смесь перемешивали посредством вращения в течение 2 часов для захвата связывающей молекулы на сефарозе. После осаждения сефарозы посредством центрифугирования и ее удаления добавляли 0,5 мл полученных отдельно супернатантов культур, содержащих различные слитые белки с циклическим пептидом (мутанты Fn10-Fc), соответственно, и полученные смеси перемешивали посредством вращения в течение 2 часов для инициации реакции. Снова осуществляли центрифугирование для осаждения сефарозы. Сефарозу три раза промывали 1 мл TBS: образец элюировали, добавляя 20 мкл буфера для образцов с SDS и нагревая до 95°C в течение 2 минут. 5 мкл полученного таким образом образца подвергали электрофорезу в восстановительных условиях с последующим окрашиванием кумасси бриллиантовым синим.

[80] Результаты электрофореза показаны на фиг. 5. Результаты эксперимента с осаждением показали, что происходит специфическое связывание между соответствующими слитыми белками (образцы №№ 2-4), содержащими аминокислотные последовательности связывающих плексин средств P6, mP6-9 и P7, и плексином В1-РА, между соответствующими слитыми белками (образцы №№ 5-7), содержащими аминокислотные последовательности связывающих Met средств aMD4, aMD5 и aML5, и

Met-РА, между слитым белком (образец № 8), содержащим аминокислотную последовательность связывающего рецептор EGF средства А6-2f, и EGFR-РА, и между слитым белком (образец № 9), содержащим аминокислотную последовательность связывающего TrkB средства trkD5, и TrkB-РА.

Fn10-Fc (образец № 1), используемый в качестве контроля, не демонстрировал связывающих свойств в отношении какого-либо рецепторного белка. Таким образом, подтверждали, что посредством презентирования на петлевой структуре Fn10 любой из восьми циклических пептидов можно преобразовывать в слитый белок, сохраняющий связывающую способность исходного циклического пептида.

[81] [Пример 2] Слияние Fc-области антитела и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида, полученную из IgG человека Fc-область (далее в настоящем описании обозначаемую как "Fc") выбирали в качестве белка, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка, и искали два аминокислотных остатка, имеющих расстояние между C α -атомами от 4 до 7 Å, в петлевой части, расположенной между β -тяжами в его стерической структуре. В результате выбирали всего восемь участков. Они представляли собой три участка из "верхней части" вблизи шарнирной области Fc, три участка из "нижней части" Fc и два участка из "части боковой поверхности" Fc. Участки, используемые для слияния в "верхней части", названы участком L1, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Ser 267 (соответствующий B_N) и Pro271 (соответствующий B_C), участком L2, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Tyr296 (соответствующий B_N) и Ser298 (соответствующий B_C), и участком L3, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Leu328 (соответствующий B_N) и Pro331 (соответствующий B_C). Участки, используемые для слияния в "нижней части", названы участком L4, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Lys360 (соответствующий B_N) и Gln362 (соответствующий B_C), участком L5, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Ser383 (соответствующий B_N) и Gln386 (соответствующий B_C), и участком L6, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Gln419 (соответствующий B_N) и Asn421 (соответствующий B_C). Участки, используемые для слияния в "части боковой поверхности", названы участком L7, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Gly341 (соответствующий B_N) и Pro343 (соответствующий B_C), и участком L8, если в качестве остатков для связывания используют два аминокислотных остатка Ser400 (соответствующий B_N) и Gly402 (соответствующий B_C). Стерическая структура этих частей показана на фиг. 6.

[82] Слитый белок конструировали, заменяя часть области, расположенной между двумя аминокислотными остатками B_N и B_C, выбранными из верхней части, нижней части

или части боковой поверхности Fc, аминокислотной последовательностью вариabельной области циклического пептида mP6-9, aMD4 или aMD5, содержащей на обеих сторонах аминокислотной последовательности произвольную линкерную аминокислоту, добавляемую при необходимости. Аминокислотная последовательность петлевой части сконструированного таким образом слитого белка после слияния с циклическим пептидом показана на фиг. 7-9.

[83] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

Конструкцию Fc-слитого белка получали, соединяя ДНК, кодирующую сигнальную последовательность пролактина человека, ДНК, кодирующую метку Hisx8, ДНК, кодирующую метку Muc, и ДНК, кодирующую Fc-область IgG1 человека, и полученную конструкцию встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific).

[84] На основе экспрессирующего вектора Fc получали экспрессирующий вектор, заменяя аминокислотную последовательность петлевой области участков L1-L8 последовательностью вставки, показанной на фиг. 7-9. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения соответствующих конструкций различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Каждый из слитых белков с циклическим пептидом обозначали как Fc(название циклического пептида_название участка), например, Fc(mP6-9_L1).

[85] Анализ посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS осуществляли посредством транзиторной экспрессии Fc и 20 слитых белков с циклическим пептидом (три пептида и варианты по 8 участкам инсерций) с использованием клеток Expi293F способом, описанным в примере 1, и осаждения полученных таким образом супернатантов культур с использованием протеин А-сефарозы.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 10. Обнаруживали полосу Fc (образец 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (30,6 кДа), и полоса для всех слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2-21) выглядела как полоса, демонстрирующая подвижность, соответствующую молекулярной массе от 30 до 37 кДа.

[86] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Связывание полученных слитых белков с циклическим пептидом (мутантов Fc) с сефарозой с NZ-1, на которой растворимые фрагменты рецептора плексин B1-PA и Met-PA фиксированы способом, описанным выше в примере 1, исследовали способом с осаждением.

[87] Результаты электрофореза показаны на фиг. 11. Результаты осаждения показали, что все восемь слитых белков (образцы №№ 2-9), содержащих аминокислотную последовательность связывающего плексин средства mP6-9, связываются с плексином B1-PA, и 11 (образцы №№ 10-13 и 15-21) из 12 слитых белков, содержащих аминокислотную последовательность связывающего Met средства aMD4 или aMD5, специфически

связываются с Met-PA (также подтверждали специфическое связывание с Fc (aMD5_L2, образец № 14)). Другими словами, подтверждали, что как и в случае Fn10-Fc, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы даже при его прямом встраивании в петлевую структуру Fc-области IgG.

[88] [Пример 3] Слияние антитела IgG и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Полноразмерный белок IgG человека (далее в настоящем описании обозначаемый как "IgG") выбирали в качестве белка, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка, для его замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида. Т.к. IgG включал в качестве части своей структуры саму Fc, являющуюся каркасным белком, используемым в примере 2, участки L1-L8, представленные в примере 2, использовали в качестве участков для слияния. Стерическая структура IgG и его Fc-области (включая участок слияния с циклическим пептидом) и две Fab-области, представляющие собой антигенсвязывающие участки, показаны на фиг. 12.

[89] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

ДНК, кодирующую полноразмерную область H-цепи моноклонального антитела IgG1 человека против нейропиллина 1, встраивали в экспрессирующий вектор р3xFLAG-CMV-14 (Sigma Aldrich). ДНК, кодирующую полноразмерную область цепи Lk указанного выше антитела, также встраивали в вектор р3xFLAG-CMV-14 аналогичным образом.

[90] Экспрессирующий вектор для H-цепи получали с использованием экспрессирующего вектора для H-цепи IgG1, заменяя аминокислотную последовательность петлевой области участков L1-L8 Fc-области вектора последовательностью вставки, показанной на фиг. 7-9. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения конструкции различных заранее определенных слитых белков H-цепи с циклическим пептидом. Каждый из слитых белков с циклическим пептидом обозначали как IgG(название пептида_название участка), например, IgG(mP6-9_L1).

[91] Каждый из экспрессирующих векторов для мутантных слитых белков H-цепи и связывающего плексин В1 циклического пептида (mP6-9) и соответствующий им экспрессирующий вектор для цепи Lk смешивали в соотношении 1:1. Аналогично описанному в примере 2, с помощью полученной смеси осуществляли встраивание в клетки Expi293F и транзиторную экспрессию. Затем осуществляли анализ посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS с помощью осаждения экспрессируемого и секретируемого таким образом белка IgG из супернатанта культуры с использованием протеин А-сефарозы.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 13А. Обнаруживали полосу неслитого IgG (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (H-цепь 47 кДа, L-цепь 25 кДа). Среди всех слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2-9)

только Н-цепь имела полосу, демонстрирующую подвижность, соответствующую молекулярной массе немного выше 47 кДа, и полоса L-цепи соответствовала 25 кДа, что равно ее массе в IgG до слияния.

[92] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Связывание полученных слитых белков с циклическим пептидом (мутантов IgG) с сефарозой NZ-1, на которой растворимый фрагмент рецептора плексин В1-РА фиксирован способом, описанным выше в примере 2, исследовали способом с осаждением.

[93] Результаты электрофореза показаны на фиг. 13В. Результаты эксперимента с осаждением показали, что все из шести слитых белков (образцы №№ 2-9), содержащих встроенную аминокислотную последовательность связывающего плексин средства mP6-9, демонстрировали связывание с плексином В1-РА. Подтверждали, что, как и при использовании Fc в отдельности, даже если циклический пептид напрямую встраивают в петлевую структуру Fc-области IgG, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы.

[94] [Пример 4] Слияние сывороточного альбумина человеком и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида, сывороточный альбумин человека (далее в настоящем описании обозначаемый как "HSA") выбирали в качестве белка, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка, и искали два аминокислотных остатка, имеющие расстояние между C α -атомами от 4 до 7 Å, в петлевой части, расположенной между α -спиралями стерической структуры альбумина. В результате, на молекуле HSA выбирали четыре участка, имеющие высокую степень воздействия растворителя. Участки, предназначенные для использования в слиянии, названы участком L1, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Asp56 (соответствующий В_N) и Ala59 (соответствующий В_C), участком L2, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Cys169 (соответствующий В_N) и Lys174 (соответствующий В_C), участком L3, если две аминокислотные последовательности Ala363 (соответствующую В_N) и Pro366 (соответствующую В_C), и участком L4, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Ala561 (соответствующий В_N) и Lys564 (соответствующий В_C). Стерическая структура указанных выше частей показана на фиг. 14.

[95] Слитый белок конструировали, заменяя часть области, расположенной между двумя аминокислотными остатками В_N и В_C, выбранными из HSA, аминокислотной последовательностью вариабельной области циклического пептида mP6-9 или aMD4, при необходимости, содержащего на обеих своих сторонах произвольную линкерную

аминокислоту. Аминокислотная последовательность петлевой части сконструированного таким образом слитого белка после слияния с циклическим пептидом показана на фиг. 15.

[96] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

ДНК, кодирующую полноразмерный сывороточный альбумин человека, ДНК, кодирующую метку Hisx8, и ДНК, кодирующую метку Мус, соединяли и получали конструкцию слитого белка HSA. Ее встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific).

[97] Экспрессирующий вектор получали с использованием экспрессирующего вектора HSA и замены аминокислотной последовательности петлевой области участков L1-L4 последовательностью вставки, показанной на фиг. 12. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения соответствующих конструкций различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Слитые белки с циклическим пептидом обозначали как HSA (название циклического пептида_название участка), например, HSA(mP6-9_L1).

[98] Анализ HSA и его восьми слитых белков с циклическим пептидом (два пептида × четыре варианта участка инсерции) посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS осуществляли посредством транзиторной экспрессии с использованием клеток Expi293F способом, описанным в примере 1, и осаждения агарозой Ni-NTA из супернатанта культуры, используя метку His, добавленную на С-конец.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 16. Обнаруживали полосу HSA (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (67 кДа), и полоса всех слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2-9) выглядела как полоса, демонстрирующая подвижность, соответствующую молекулярной массе, немного превышающей молекулярную массу указанной выше полосы.

[99] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Связывание полученных слитых белков с циклическим пептидом (мутантов HSA) с растворимым фрагментом рецептора плексин В1 или Met подтверждали способом, описанным выше в примере 1. Однако следует отметить, что в случае слитого белка с пептидом mP6-9 в качестве связывающей молекулы использовали не плексин В1-РА, а плексин В1-Fc, а в качестве частиц для осаждения использовали не NZ-1-сефарозу, а протеин А-сефарозу.

[100] Результаты электрофореза показаны на фиг. 17. Результаты эксперимента с осаждением показали, что все из четырех слитых белков (образцы №№ 2-5), содержащих встроенную аминокислотную последовательность связывающего плексин средства mP6-9, связываются с плексином В1-Fc, и все из четырех слитых белков (образцы №№ 6-9), содержащих встроенное связывающее Met средство aMD4, специфически связываются с Met-РА. Подтверждали, что в случае HSA (образец № 1), с которым не слит циклический пептид, обнаруживали только неспецифическую полосу, которую также можно наблюдать в контрольном супернатанте культуры без белка HSA (образец № 10), и образец не

связывался со связывающей молекулой. Другими словами, подтверждали, что, аналогично Fn10-Fc или Fc, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы даже при прямом его встраивании в петлю, расположенную между α -спиралями HSA.

[101] [Пример 5] Слияние гормона роста человека и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида гормон роста человека (далее в настоящем описании обозначаемый как "hGH") выбирали в качестве белка, содержащего петлевую структуру, и искали два аминокислотных остатка, имеющие расстояние между C α -атомами от 4 до 7 Å, в петлевой части, расположенной между α -спиралями в стерической структуре гормона. В результате, на молекулярной структуре hGH выбирали два участка, соответствующих верху длинной оси. Участки, предназначенные для использования в слиянии, названы участком L1, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Asp130 (соответствующий V_N) и Ser132 (соответствующий V_C), и участком L2, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Asn152 (соответствующий V_N) и Asp154 (соответствующий V_C). Стерическая структура указанных выше частей показана на фиг. 18.

[102] Слитый белок конструировали посредством замены части области, расположенной между двумя аминокислотными остатками V_N и V_C, выбранными из hGH, аминокислотной последовательностью варибельной области циклического пептида mP6-9, содержащей произвольную линкерную аминокислоту, добавленную при необходимости на обе стороны аминокислотной последовательности. Аминокислотная последовательность петлевой части сконструированного слитого белка после слияния циклического пептида показана на фиг. 19.

[103] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

В качестве экспрессирующего вектора для гормона роста человека использовали pSGHV0 (описанный в Protein Expr. Purif., 2000, 20(3), 500-506), полученный посредством добавления метки Hisx8 и последовательности распознавания протеазы TEV на C-конец полноразмерного hGH. Экспрессирующий вектор получали с использованием описанного выше вектора и замены аминокислотной последовательности петлевой области участков L1 и L2 последовательностью вставки, показанной на фиг. 19. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения соответствующих конструкций различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Слитые белки с циклическим пептидом обозначали как hGH(название циклического пептида_название участка), например, hGH(mP6-9_L1).

[104] Анализ hGH и двух слитых белков с циклическим пептидом (один пептид × два варианта участка инсерции) посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS осуществляли с помощью транзитной экспрессии с использованием клеток Expi293F способом, описанным в примере 1, и инициации осаждения агарозой Ni-NTA из

супернатанта культуры.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 20А. Обнаруживали полосу hGH (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (26 кДа), и полоса двух слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2 и 3) выглядела как полоса, демонстрирующая подвижность, соответствующую молекулярной массе, немного превышающей массу указанной выше полосы.

[105] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Связывание полученного слитого белка с циклическим пептидом (мутанта hGH) с сефарозой с NZ-1, на которой растворимый фрагмент рецептора плексин В1-РА фиксирован способом, описанным выше в примере 1, исследовали способом с осаждением.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 20В. Результаты эксперимента с осаждением показали, что hGH дикого типа (образец № 1) не связывается с плексином В1-РА, но два слитых белка (образцы №№ 2 и 3), содержащие встроенную последовательность связывающего плексин средства mP6-9, специфически связывались с ним. Другими словами, подтверждали, что, как и в случае Fn10-Fc, Fc или HSA, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы даже при прямом его встраивании в петлю секретируемого гормона hGH.

[106] [Пример 6] Слияние сывороточного ретинолсвязывающего белка человека и циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида ретинолсвязывающий белок человека (далее в настоящем описании обозначаемый как "RBP") выбрали в качестве липид-связывающего белка, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка, и искали два аминокислотных остатка, имеющие расстояние между C α -атомами от 4 до 7 Å, в петлевой части, расположенной между β -тяжами в стерической структуре белка. В результате, выбрали два шпильчатых петлевых участка, выступающих из структуры β -бочки RBP. Участки, предназначенные для использования в слиянии, названы участком L1, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Leu 64 (соответствующий В_N) и Trp67 (соответствующий В_C), и участком L2, если в качестве остатка для связывания используют два аминокислотных остатка Ala94 (соответствующий В_N) и Leu97 (соответствующий В_C). Стерическая структура указанных выше участков показана на фиг. 21.

[107] Слитый белок конструировали посредством замены части области, расположенной между двумя аминокислотными остатками В_N и В_C, выбранными из RBP, аминокислотной последовательностью варибельной области циклического пептида mP6-9, содержащего произвольную линкерную аминокислоту, добавленную при

необходимости на обе стороны аминокислотной последовательности. Аминокислотная последовательность петлевой части сконструированного слитого белка после слияния с циклическим пептидом показана на фиг. 22.

[108] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

Экспрессирующий вектор для RBP человека получали посредством соединения ДНК, кодирующей полноразмерный RBP, и ДНК, кодирующей РА-метку, друг с другом и полученный вектор встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific). Экспрессирующий вектор получали с использованием описанного выше вектора и замены аминокислотной последовательности петлевой области участков L1 и L2 последовательностью вставки, показанной на фиг. 22. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения конструкции различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Слитые белки с циклическим пептидом обозначали как RBP(название циклического пептида_название участка), например, RBP(mP6-9_L1).

[109] Анализ RBP и двух слитых белков с циклическим пептидом (один пептид × два варианта участка инсерции) посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS осуществляли с помощью транзиторной экспрессии с использованием клеток Expi293F способом, описанным в примере 1, и инициации осаждения сефарозой (Wako Pure Chemical Industries), на которой иммобилизовано NZ1, являющееся антителом против РА-метки, из супернатанта культуры.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 23А. Обнаруживали полосу RBP (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (25кДа), и полоса двух слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2 и 3) выглядела как полоса, демонстрирующая подвижность, соответствующую молекулярной массе, немного превышающей массу указанной выше полосы.

[110] 3. Получение слитого белка с циклическим пептидом и его связывание со связывающей молекулой

Связывание полученного слитого белка с циклическим пептидом (мутантом RBP) с протеин А-сефарозой, на которой растворимый фрагмент рецептора плексин В1-Fc фиксирован способом, аналогичным описываемому выше, исследовали способом с осаждением.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 23В. Результаты эксперимента с осаждением показали, что RBP дикого типа (образец № 1) не связывался с плексином В1-Fc, но с ним специфически связывались два слитых белка (образцы №№ 2 и 3), содержащие встроенную последовательность связывающего плексин средства mP6-9. Другими словами, подтверждали, что, как и в случае Fn10-Fc, Fc, HSA и hGH, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы даже при прямом его встраивании в петлю липид-связывающего секреторного белка RBP.

[111] [Пример 7] Слияние плацентарной щелочной фосфатазы человека и

циклического пептида

1. Дизайн слитого белка с циклическим пептидом

Для замены химически перекрестно сшитой структурой физиологически активного циклического пептида, плацентарную щелочную фосфатазу человека (далее в настоящем описании обозначаемую как "PLAP") выбирали в качестве белка-фермента, содержащего петлевую структуру и служащего в качестве каркасного белка. Из петлевой части, отделенной от активного центра фермента в стерической структуре щелочной фосфатазы, в качестве остатков для связывания выбирали два аминокислотных остатка Lys404 (соответствующий B_N) и Gly406 (соответствующий B_C), имеющие расстояние между $C\alpha$ -атомами 5,5 Å. Стерическая структура указанных выше частей показана на фиг. 24.

[112] Слитый белок конструировали посредством замены части области, расположенной между двумя аминокислотными остатками B_N и B_C , выбранными из PLAP, аминокислотной последовательностью варибельной области циклического пептида mP6-9 или aMD4, содержащей произвольную линкерную аминокислоту, добавленную при необходимости на обе стороны аминокислотной последовательности. Аминокислотная последовательность петлевой части сконструированного слитого белка после слияния с циклическим пептидом показана на фиг. 25.

[113] 2. Получение слитого белка с циклическим пептидом

В качестве экспрессирующего вектора для плацентарной щелочной фосфатазы человека использовали вектор pAPtag-5 (описанный в *Methods Enzymol.* 2000, 327, 19-35), полученный посредством добавления метки Muc и метки Hisx6 на C-конец полноразмерной PLAP. Экспрессирующий вектор получали с использованием описанного выше вектора и замены петлевой области последовательностью вставки, показанной на фиг. 25. Последовательность вставки амплифицировали способом ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов для получения конструкции различных заранее определенных слитых белков с циклическим пептидом. Каждый из слитых белков с циклическим пептидом обозначали как PLAP(название циклического пептида), например, PLAP(mP6-9).

[114] Анализ PLAP и двух слитых белков с циклическим пептидом (два пептида × один участок инсерции) посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS осуществляли с помощью транзиторной экспрессии с использованием клеток Expi293F способом, описанным выше в примере 1, и инициации осаждения агарозой Ni-NTA из супернатанта культуры.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 26. Обнаруживали полосу PLAP (образец № 1), соответствующую ожидаемой молекулярной массе (74 кДа), и полоса двух слитых белков с циклическим пептидом (образцы №№ 2 и 3) выглядела как полоса, демонстрирующая подвижность, соответствующую молекулярной массе, немного превышающей массу указанной выше полосы.

[115] 3. Связывание слитого белка с циклическим пептидом со связывающей молекулой

Связывание полученного слитого белка с циклическим пептидом (мутанта PLAP) с протеин А-сефарозой, на которой растворимый фрагмент рецептора плексин В1-Fc или Met-Fc фиксирован способом, описанным выше в примере 1, исследовали способом с осаждением.

Результаты электрофореза показаны на фиг. 27. Результаты эксперимента с осаждением показали, что PLAP дикого типа (образец № 1) не связывалась с плексином В1-Fc или Met-Fc, но слитый белок (образец № 2), содержащий встроенную последовательность связывающего плексин средства mP6-9, и слитый белок (образец № 3), содержащий встроенную последовательность aMD4, специфически связывались с плексином В1-Fc и Met-Fc, соответственно. Другими словами, подтверждали, что, как и в случае Fn10-Fc, Fc, HSA, hGH и RBP, циклический пептид можно преобразовывать в слитый белок при сохранении его связывающей активности в отношении связывающей молекулы даже при прямом встраивании в петлю белка-фермента PLAP.

[116] [Пример 8] Физиологическая активность слитого белка с циклическим пептидом

Связывающее плексин В1 средство пептид Р6 и его аналог mP6-9 связываются с плексином В1, экспрессирующимся на клетках, и ингибируют передачу его сигнала. Для исследования того, проявляет ли пептид, слитый с белком, свою ингибиторную активность, оценивали влияние стимуляции семафоринем 4D (Sema4D) на морфологическое изменение клеток, экспрессирующих плексин В1.

[117] Морфологическое изменение клеток измеряли импедансным способом с использованием устройства xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences). После высевания стабильно экспрессирующих плексин В1 клеток (описанных в Cell Chem. Biol, 2016, 23, 1341-1350) на планшет E-PlateView16PET (ACEA Biosciences) в концентрации 6000 клеток/лунку, их культивировали при 37°C в течение 20 часов. Затем в среду добавляли от 1 нМ до 1 мкМ слитого белка с пептидом mP6-9, описанного в примере 2, и держали в тепле в течение 30 минут. В качестве стимулятора добавляли белок Sema4D-Fc (R&D Systems) до конечной концентрации 1 нМ и осуществляли мониторинг электрического сопротивления клеток.

[118] Результаты показаны на фиг. 28. Непосредственно после добавления Sema4D-Fc происходило значительное снижение электрического сопротивления, что позволяет предполагать, что происходило морфологическое изменение клеток, и область адгезии уменьшалась. С другой стороны, выявлено, что морфологическое изменение клеток, предварительно обработанных шестью слитыми белками, ингибировалось в зависимости от концентрации добавляемого слитого белка, и все слитые белки блокировали активацию плексина В1 почти полностью при концентрации 100 нМ или более. Это означает, что исходная эффективность циклического пептида mP6-9 в качестве ингибитора передачи сигнала плексина В1 сохраняется даже после преобразования в слитый белок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ презентирования циклического пептида на белке, содержащем петлевую структуру, включающий:

использование в качестве циклического пептида, содержащего химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры, и

замену химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, и слияние циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру.

2. Способ по п.1, где два аминокислотных остатка, образующие петлевую структуру, имеют расстояние между C α -атомами в диапазоне от 4 до 7 Å.

3. Способ по п.1 или 2, где белок, содержащий петлевую структуру, содержит от 1 до 15 аминокислотных остатков между двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

4. Способ по любому из пп.1-3, где циклический пептид состоит из протеиногенной аминокислоты и/или непротеиногенной аминокислоты.

5. Способ по любому из пп.1-4, где химически перекрестно сшитая структура содержит тиозфирную связь или дисульфидную связь.

6. Способ по любому из пп.1-5, где каждый из двух или более циклических пептидов подвергают слиянию с соответствующим образом отличающимися петлевыми структурами белка, содержащего множество петлевых структур.

7. Способ по п. 6, где два или более циклических пептида имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

8. Способ по п.6, где два или более циклических пептида имеют соответствующим образом отличающиеся аминокислотные последовательности.

9. Способ по любому из пп.1-8, где при замене химически перекрестно сшитой структуры циклического пептида двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида с помощью линкерной последовательности заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру.

10. Способ по любому из пп.1-9, где химически перекрестно сшитую структуру циклического пептида заменяют двумя аминокислотными остатками, образующими петлевую структуру, при включении аминокислотной последовательности, образующей петлевую структуру, иной, чем две аминокислоты, образующие петлевую структуру.

11. Способ слияния циклического пептида с белком, содержащим петлевую структуру, и, таким образом, получения модифицированного белка, содержащего циклический пептид, презентированный на белке, включающий:

использование в качестве циклического пептида, содержащего химически перекрестно сшитую структуру для получения внутримолекулярной циклической структуры,

выбор из аминокислотной последовательности циклического пептида частичной аминокислотной последовательности, предназначенной для презентирования на белке, и выбор последовательности оснований, соответствующей частичной аминокислотной последовательности,

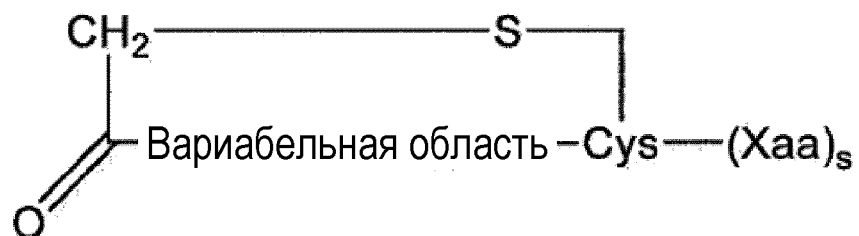
выбор последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным последовательностям, образующим петлевую структуру белка, содержащего петлевую структуру, соответственно, удаление основания, находящегося между выбранными последовательностями оснований, при необходимости, и получение нуклеиновой кислоты, содержащей встроенную последовательность оснований, соответствующую частичной аминокислотной последовательности выбранного циклического пептида, и

трансляцию нуклеиновой кислоты.

12. Модифицированный белок, полученный способом получения по п.11.

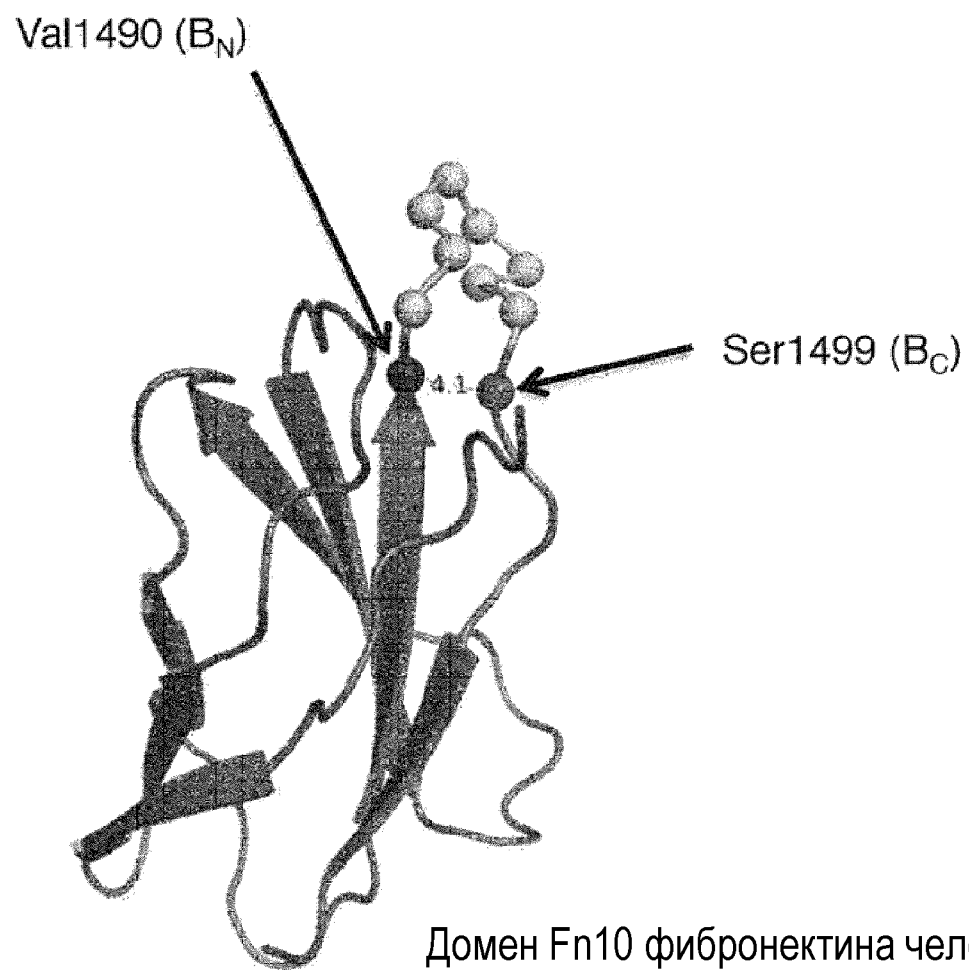
По доверенности

ФИГ.1



Название циклического пептида	Связывающая молекула	Аминокислотная последовательность вариабельной области
P6	Плексин В1 человека	wRPRVARWTGQIIY
mP6-9	Плексин В1 человека	wRPYIERWTGRLIV
P7	Плексин В1 человека	wNSNVLSWQTYSWY
aMD4	Рецептор Met человека	yRQFNRRTHEVWNLD
aMD5	Рецептор Met человека	yWYYAWDQTYKAFP
aML5	Рецептор Met человека	YISWNEFNSPNWRFIT
A6-2f	Рецептор EGF человека	yASFPEELDEWYVAYG
trkD5	TrkB человека	yRQASPKFTFWS

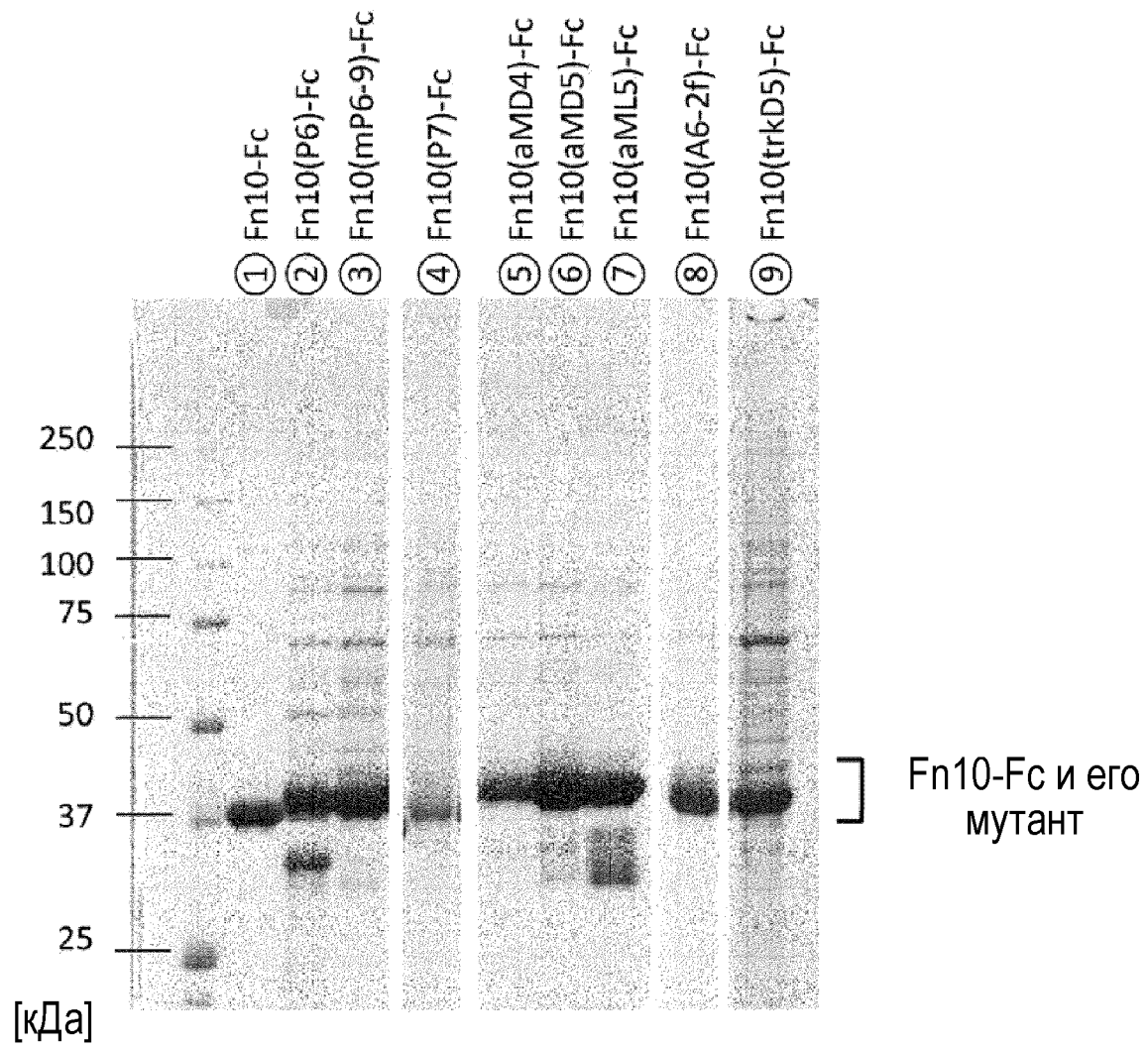
ФИГ.2



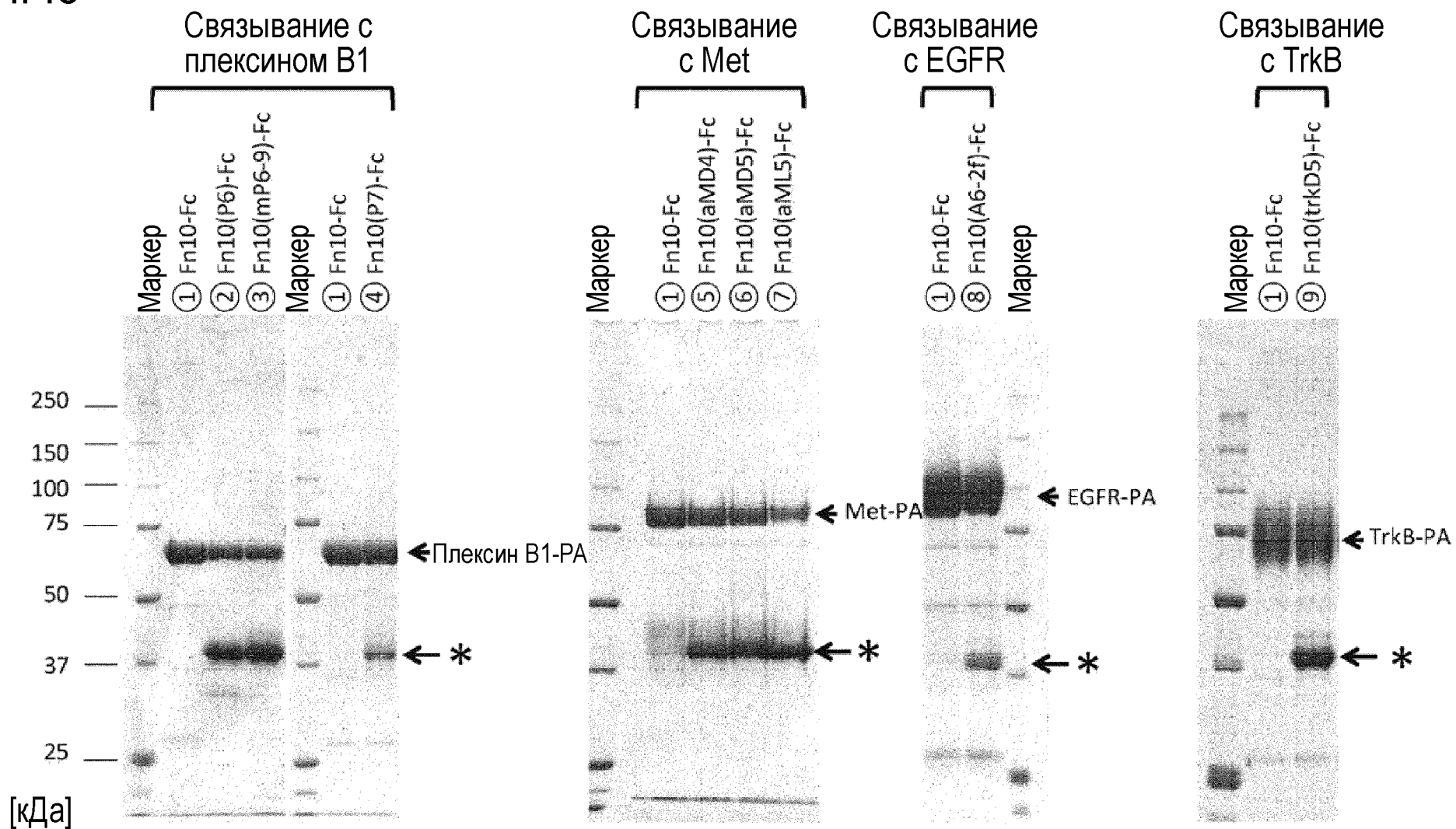
ФИГ.3

Fn10	...TVYAV TGRGD-----SPA SSKPISINYR....
Fn10(P6)-Fc	...TVYAV TGR-- <u>WRPRVARWTGQIIY</u> -----SPA SSKPISINYR....
Fn10(mP6-9)-Fc	...TVYAV TGR-- <u>WRPYIERWTGRLIV</u> -----SPA SSKPISINYR....
Fn10(P7)-Fc	...TVYAV TGRGGSGCNSNVLSWOTYSWYCGGSSPA SSKPISINYR....
Fn10(aMD4)-Fc	...TVYAV TGRGGYRQFNRRTHEVWNLDG----SPA SSKPISINYR....
Fn10(aMD5)-Fc	...TVYAV TGRGSYWYYAWDOTYKAFPGS----SPA SSKPISINYR....
Fn10(aML5)-Fc	...TVYAV TGRGGYISWNEFNPNWRFITG---SPA SSKPISINYR....
Fn10(A6-2f)-Fc	...TVYAV TGRGGSYASFPEELDEWYVAYGG--SPA SSKPISINYR....
Fn10(trkD5)-Fc	...TVYAV TGRGGSYRQASPKFTFWSSGG-----SPA SSKPISINYR....

ФИГ.4

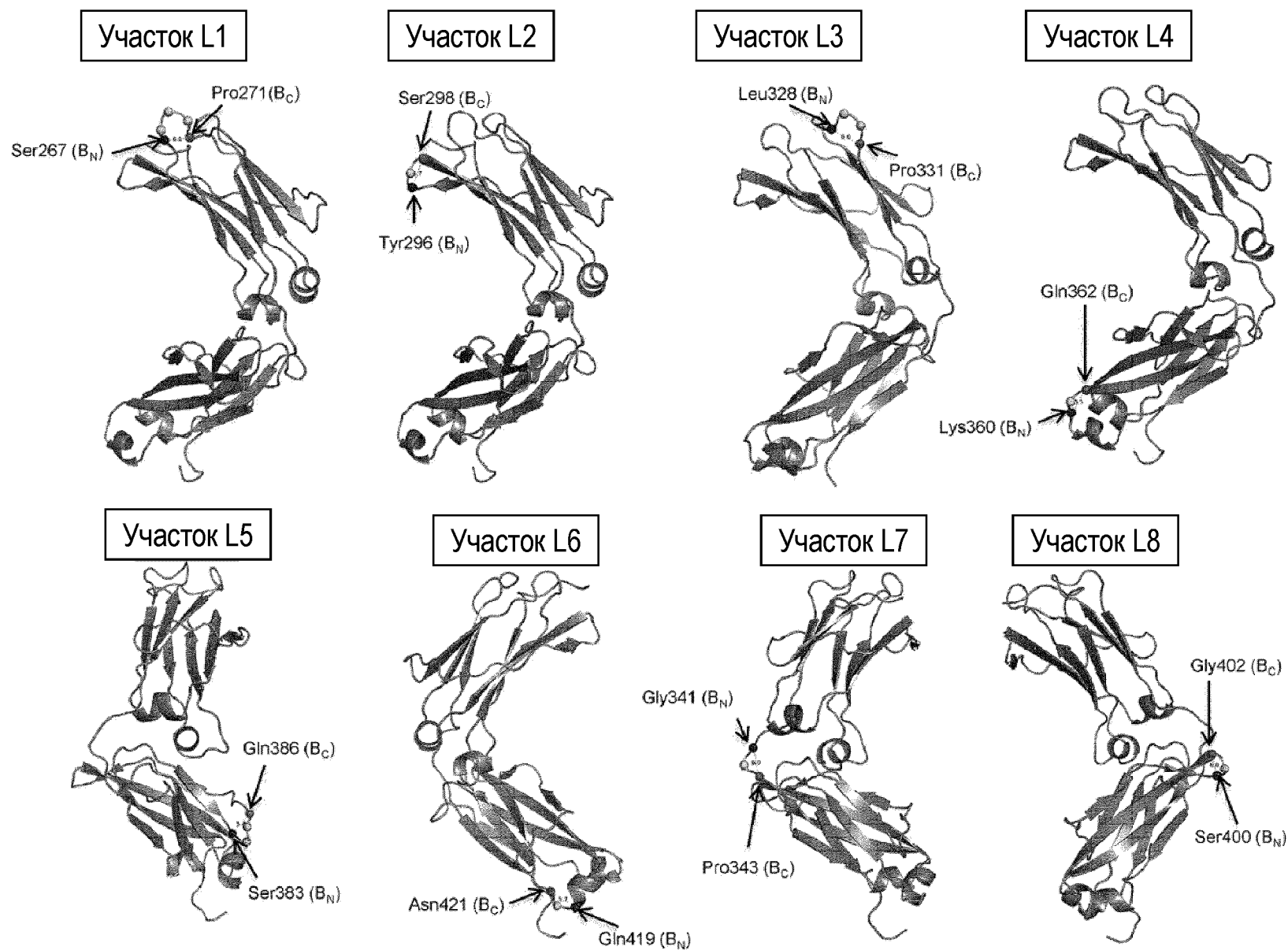


ФИГ.5



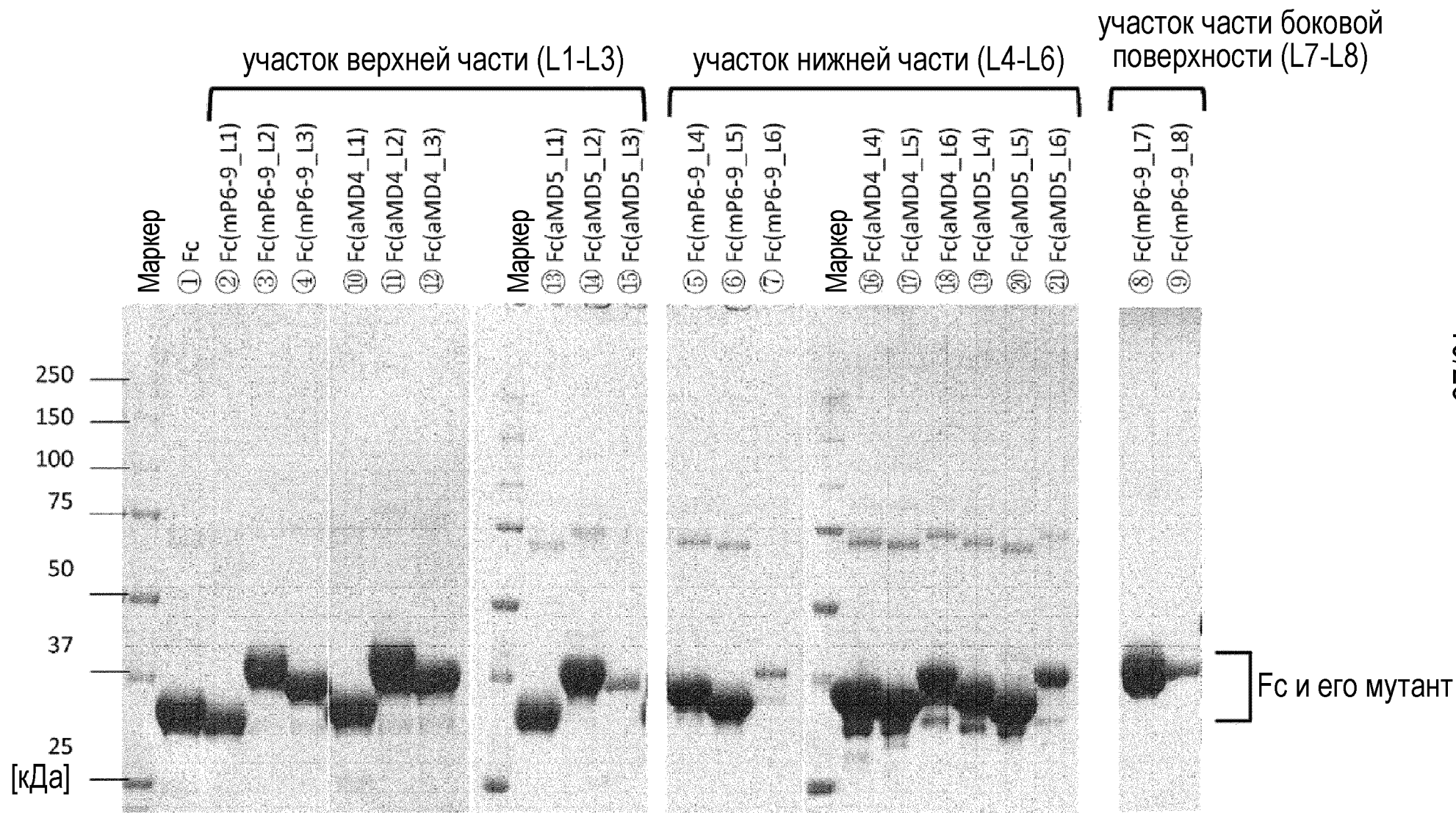
*Полоса слитого белка с циклическим пептидом (мутант Fn10-Fc)

ФИГ.6

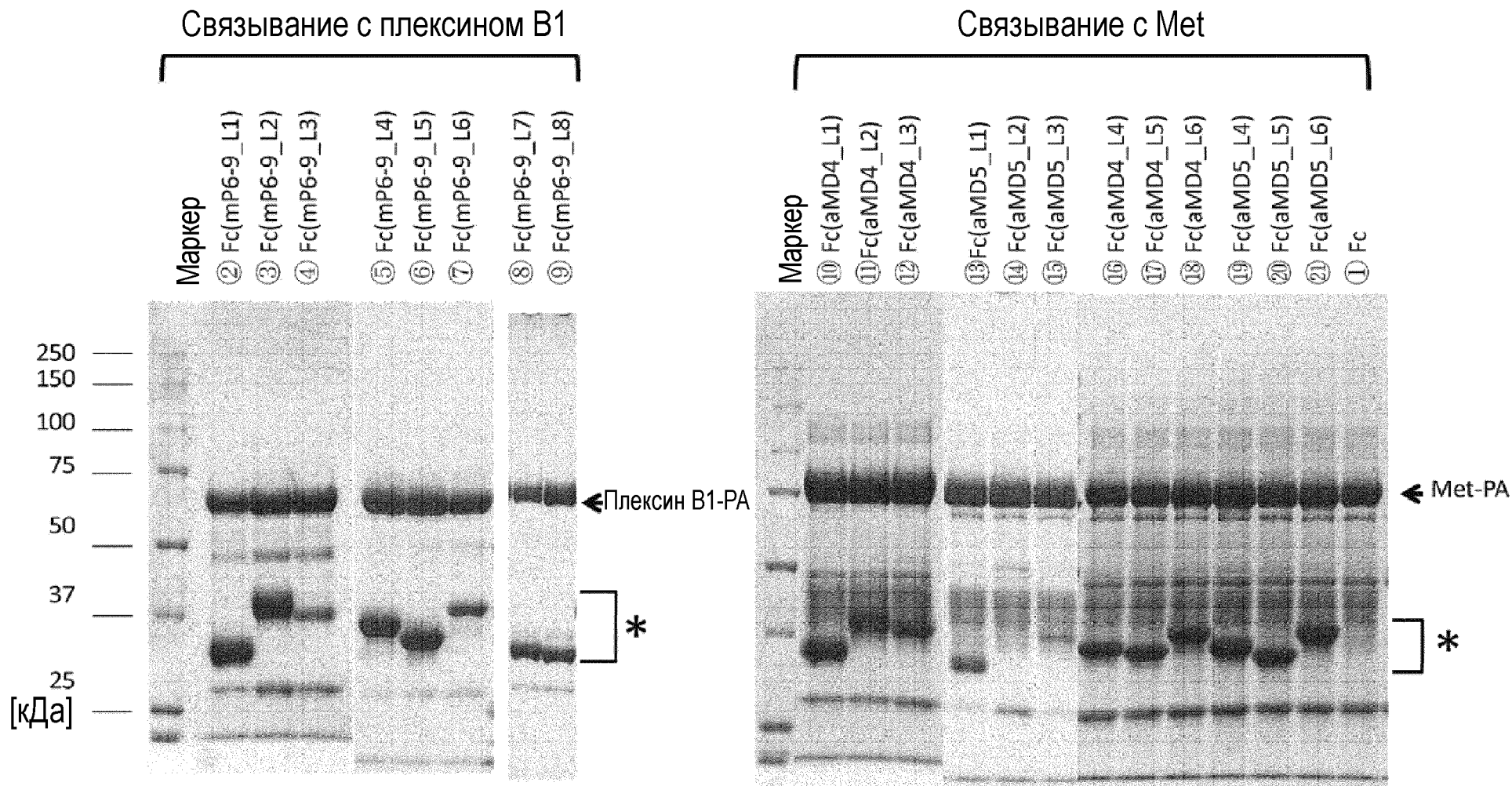


Fc IgG1 человека (PDB ID: 1HZH)

ФИГ.10

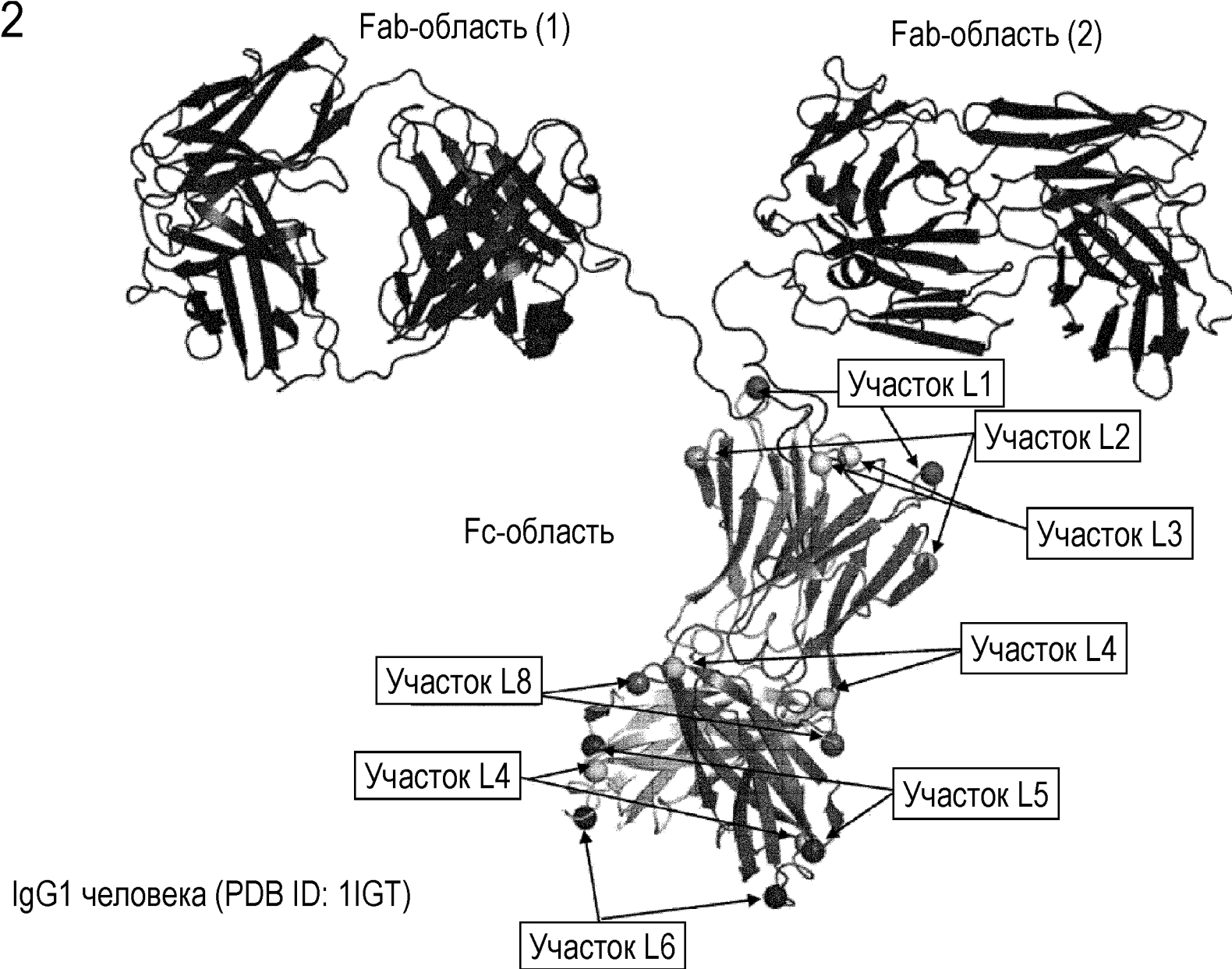


ФИГ.11

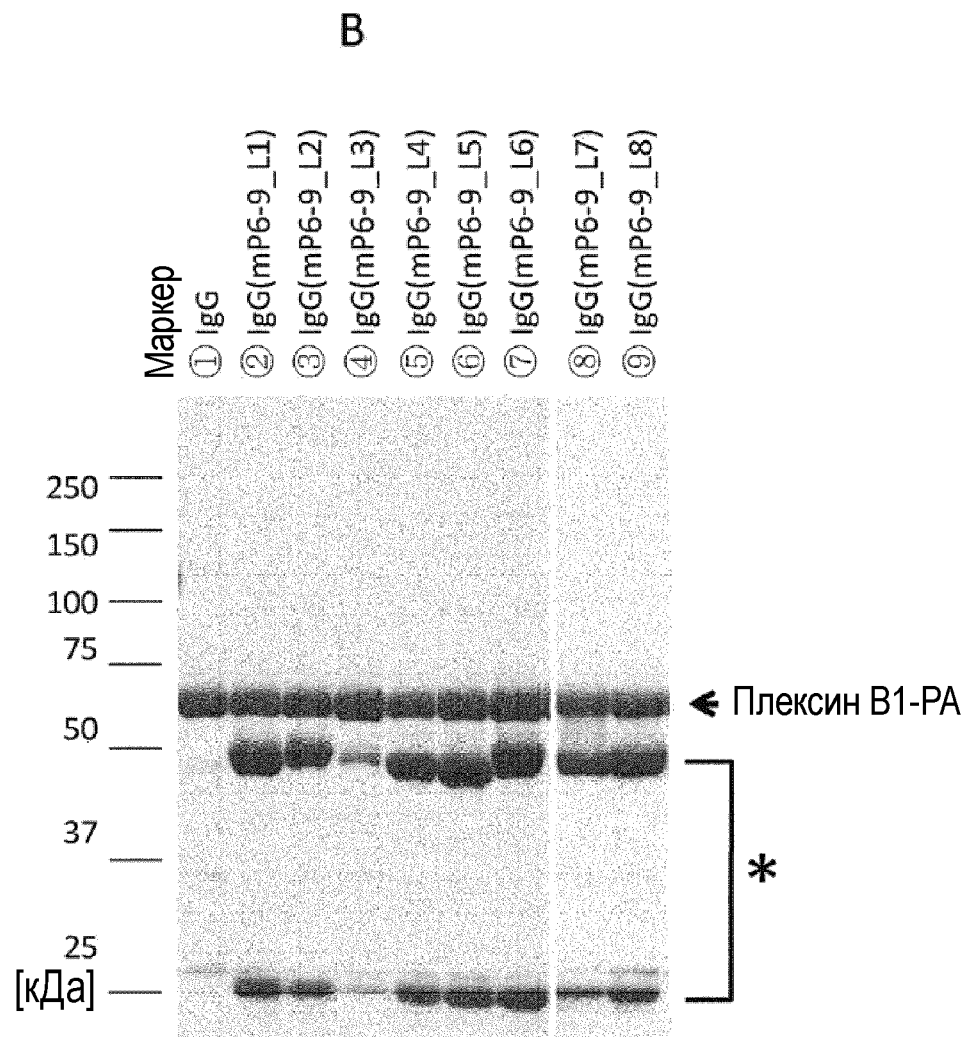
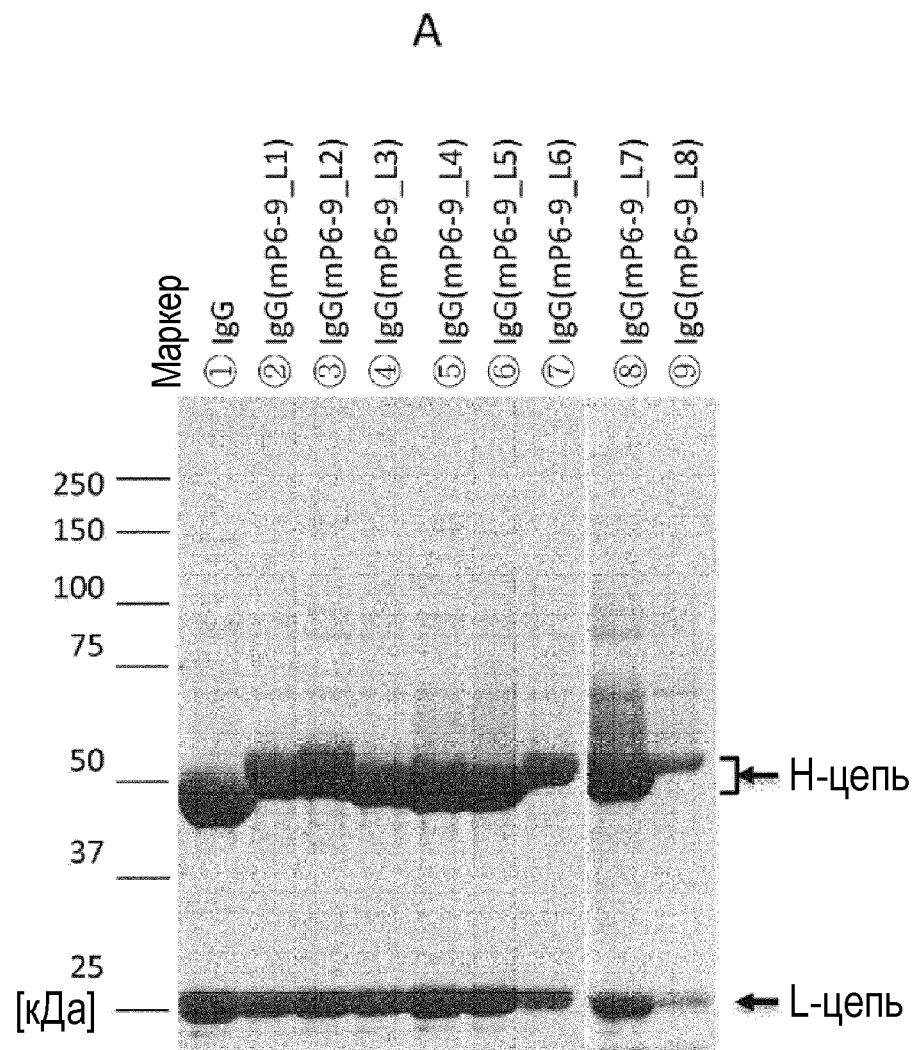


*Полоса слитого белка с циклическим пептидом (мутант Fc)

ФИГ.12

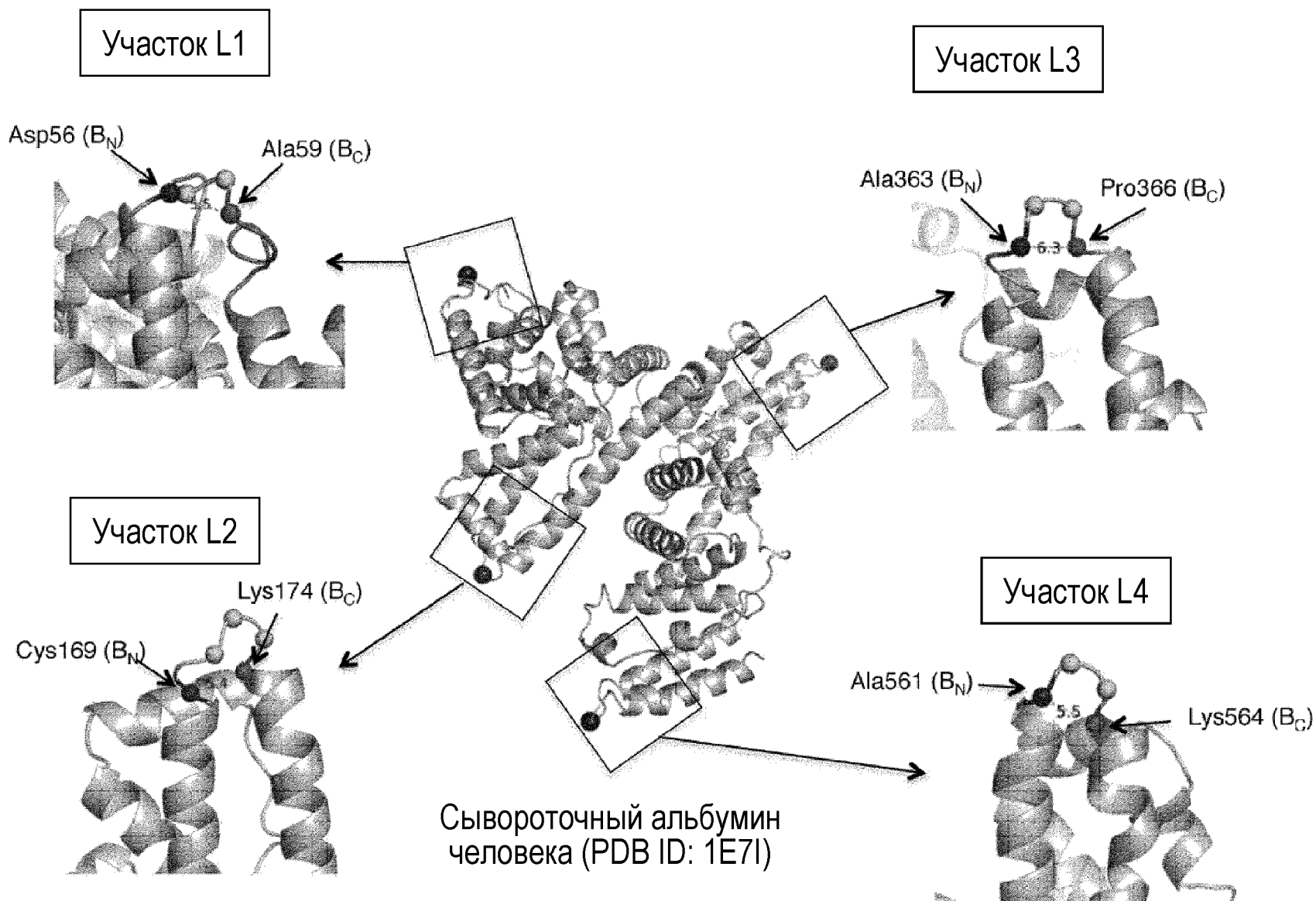


ФИГ.13



*Полоса IgG (H-цепь и L-цепь)

ФИГ.14



ФИГ.15

1. Мутант по участку L1

```

HSA      ...TCVAD ES----- AENC DK....
HSA(mP6-9_L1) ...TCVAD E-GWRPYIERWTGRLIVGG- AENC DK....
HSA(αMD4_L1) ...TCVAD ESGYRQFNRRRTHEVWNLDGS AENC DK....
          ↑      ┌──────────────────────────┐      ↑
          Asp56 (BN)  Последовательность      Ala59 (BC)
                    вставки
    
```

2. Мутант по участку L2

```

HSA      ...FTECC QAA-----D KAACL L....
HSA(mP6-9_L2) ...FTECC QA-GWRPYIERWTGRLIVGG-D KAACL L....
HSA(αMD4_L2) ...FTECC QAAGYRQFNRRRTHEVWNLDGSD KAACL L....
          ↑      ┌──────────────────────────┐      ↑
          Cys169 (BN)  Последовательность      Lys174 (BC)
                    вставки
    
```

3. Мутант по участку L3

```

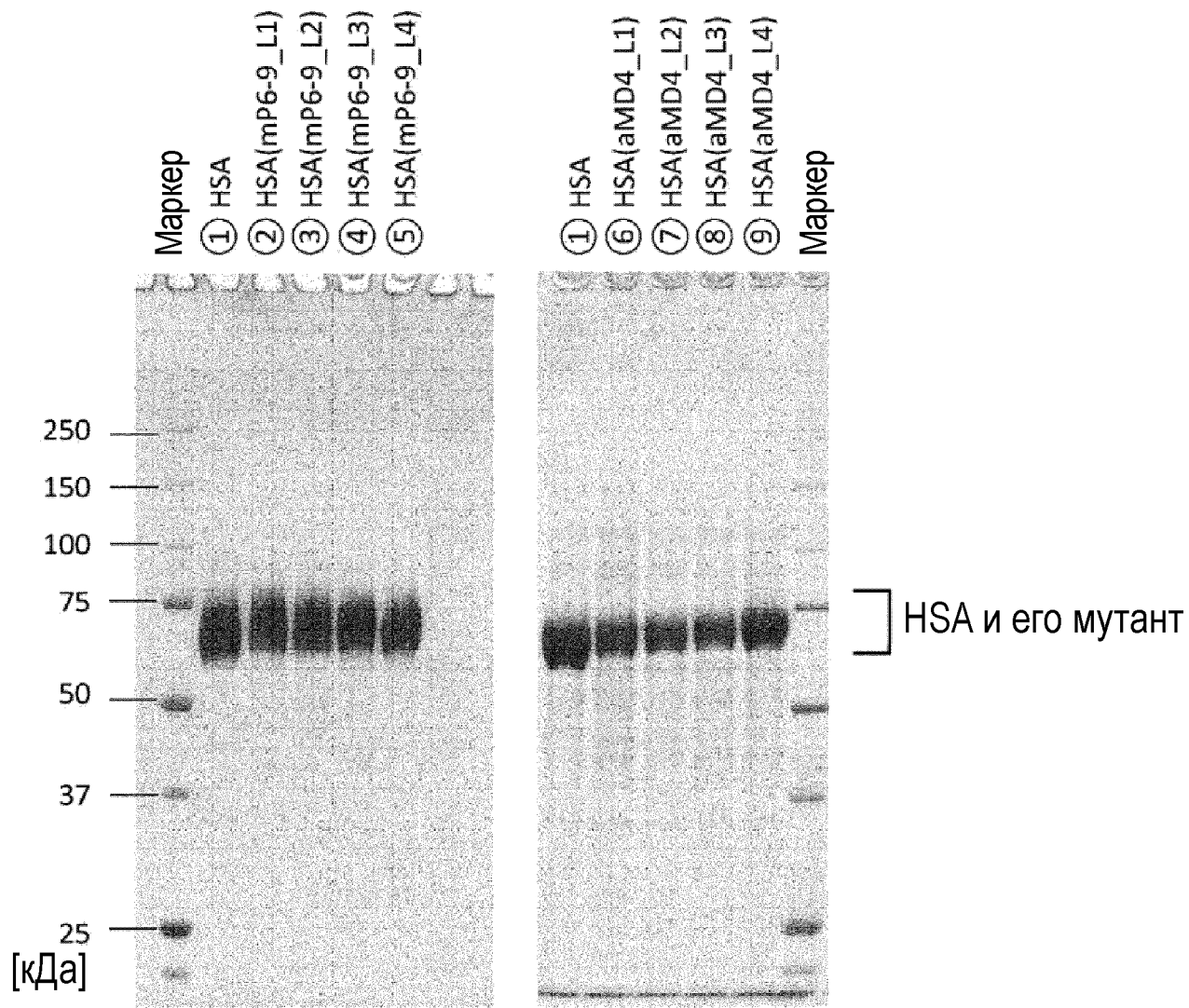
HSA      ..EKCCAA A-----D PHECYA....
HSA(mP6-9_L3) ..EKCCAA -GWRPYIERWTGRLIVGG-D PHECYA....
HSA(αMD4_L3) ..EKCCAA AGYRQFNRRRTHEVWNLDGSD PHECYA....
          ↑      ┌──────────────────────────┐      ↑
          Ala363 (BN)  Последовательность      Pro366 (BC)
                    вставки
    
```

3. Мутант по участку L4

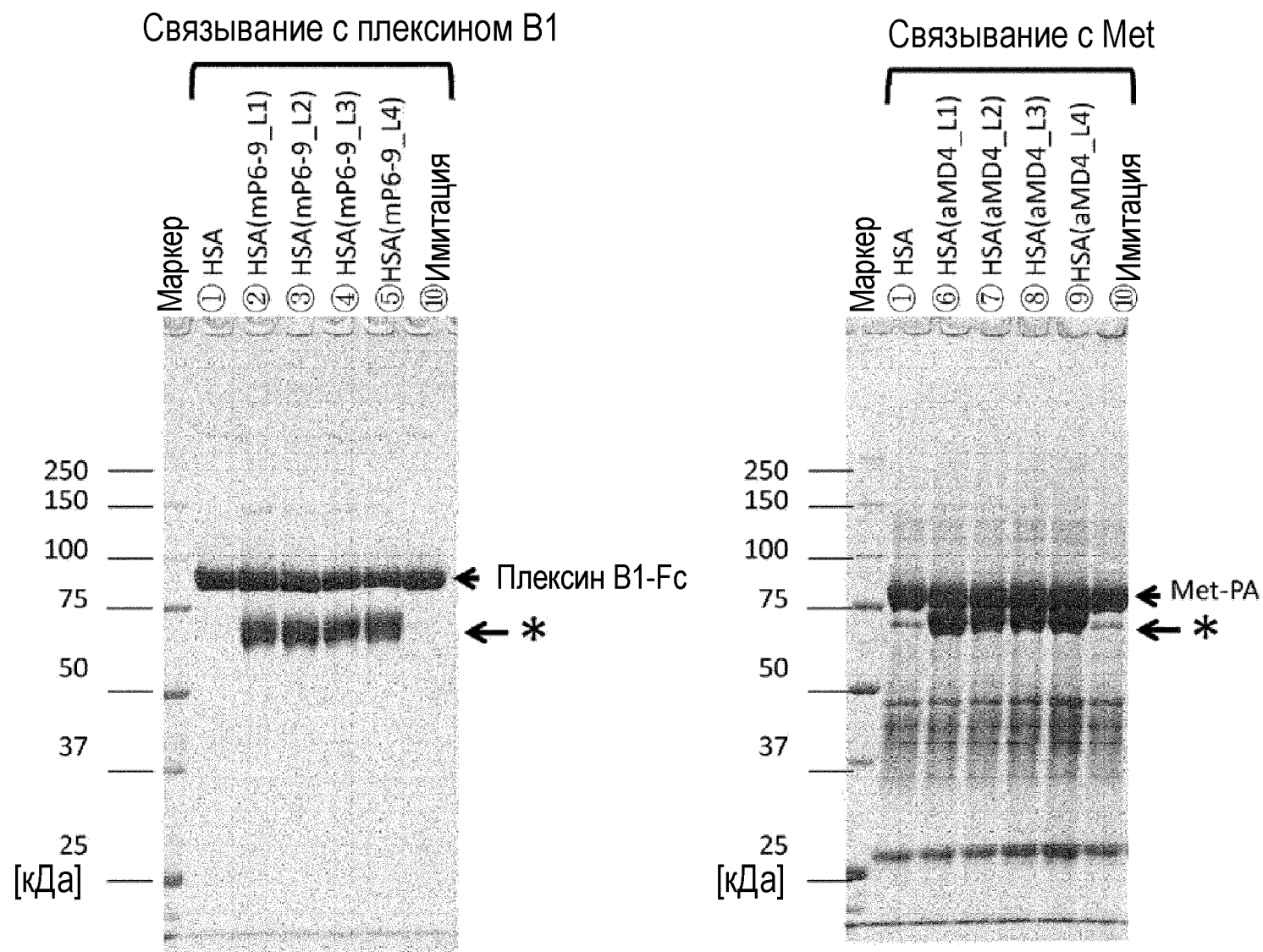
```

HSA      ...KCCKA D-----D KETCFA....
HSA(mP6-9_L4) ...KCCKA GWRPYIERWTGRLIVGG--D KETCFA....
HSA(αMD4_L4) ...KCCKA GGYRQFNRRRTHEVWNLDGGD KETCFA....
          ↑      ┌──────────────────────────┐      ↑
          Ala561 (BN)  Последовательность      Lys564(BC)
                    вставки
    
```

ФИГ.16

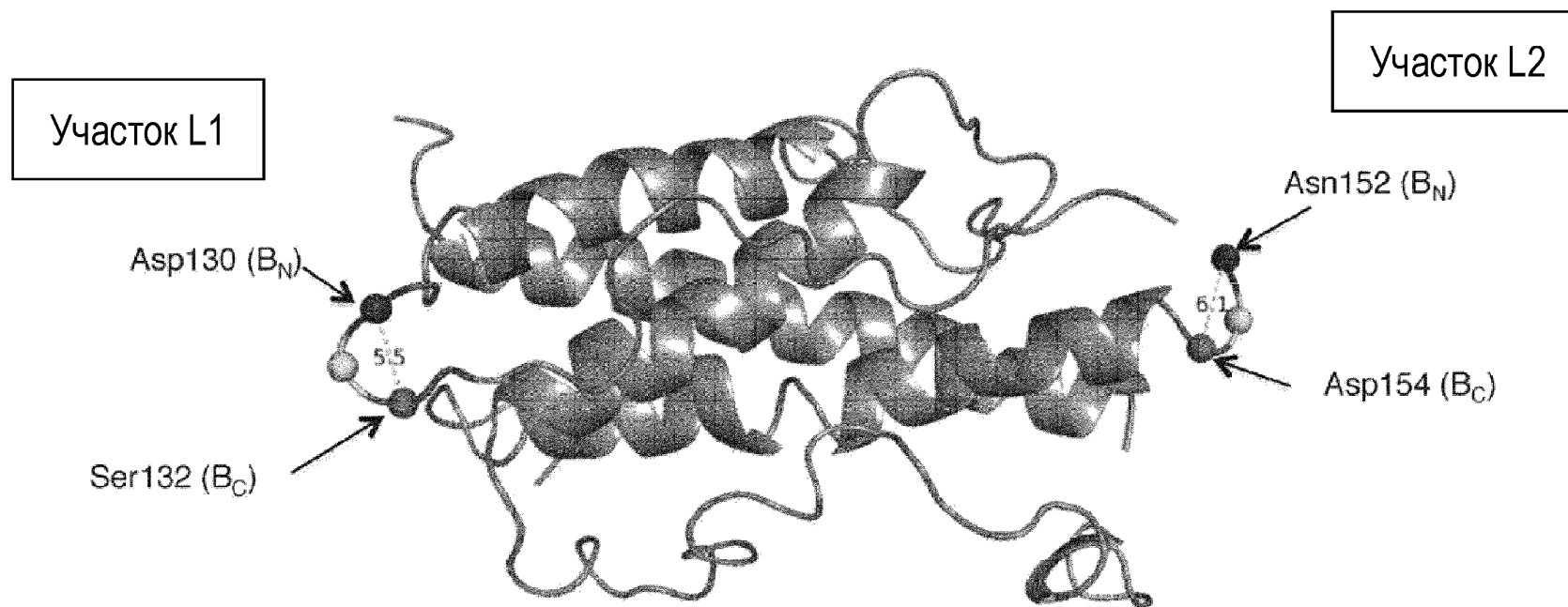


ФИГ.17



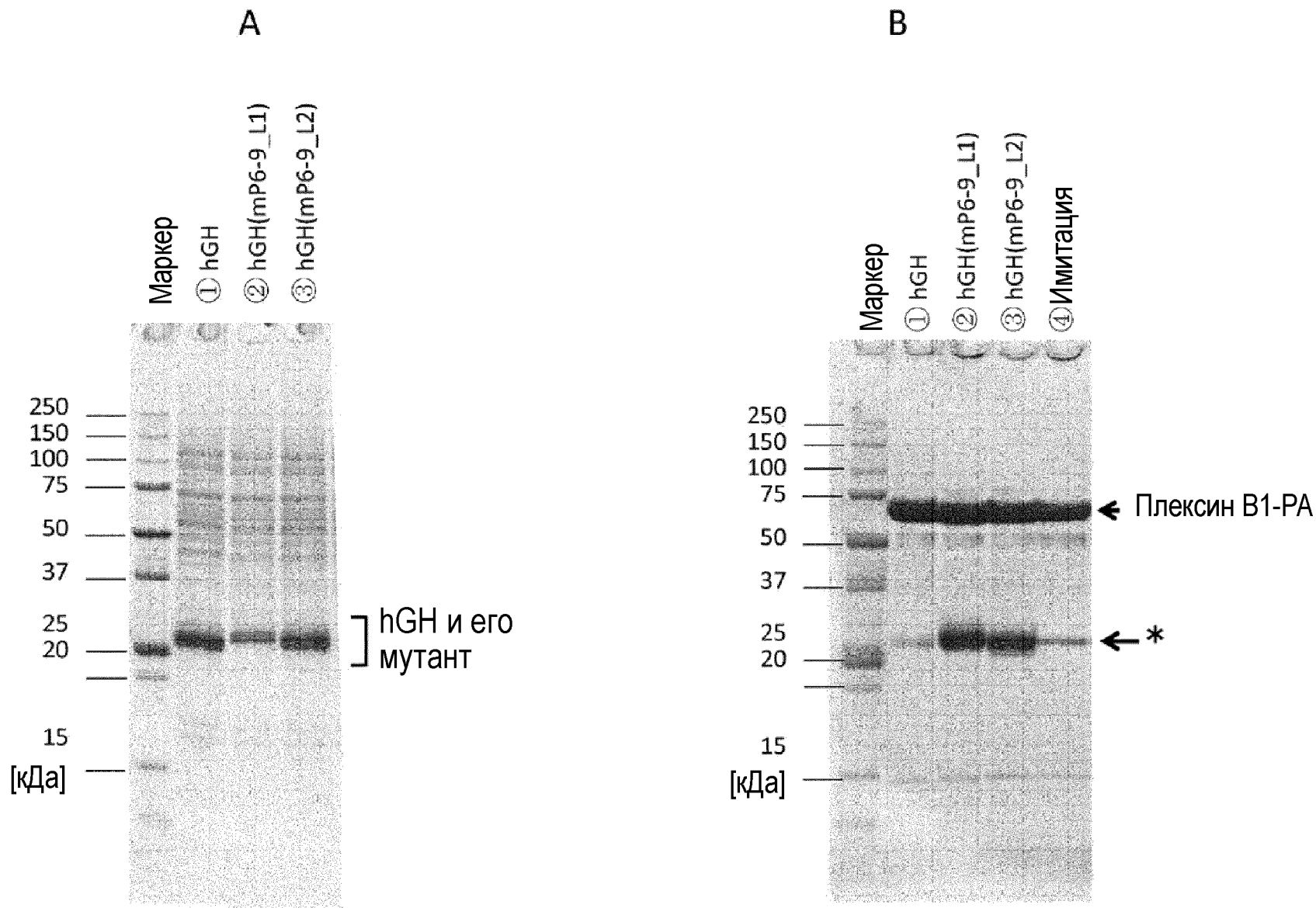
*Полоса слитого белка с циклическим пептидом (мутант HSA)

ФИГ.18



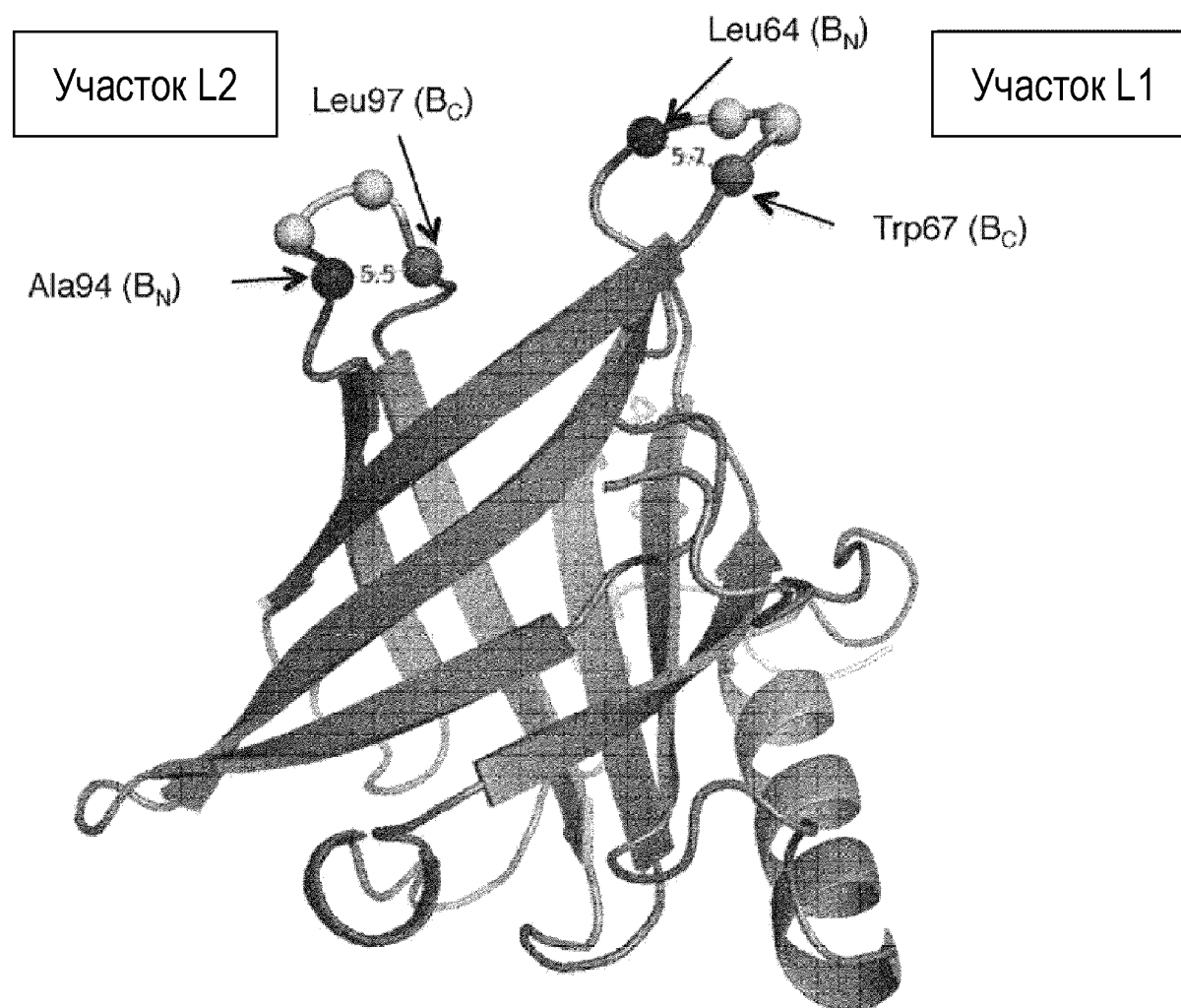
Гормон роста человека (PDB ID: 1HGU)

ФИГ.20



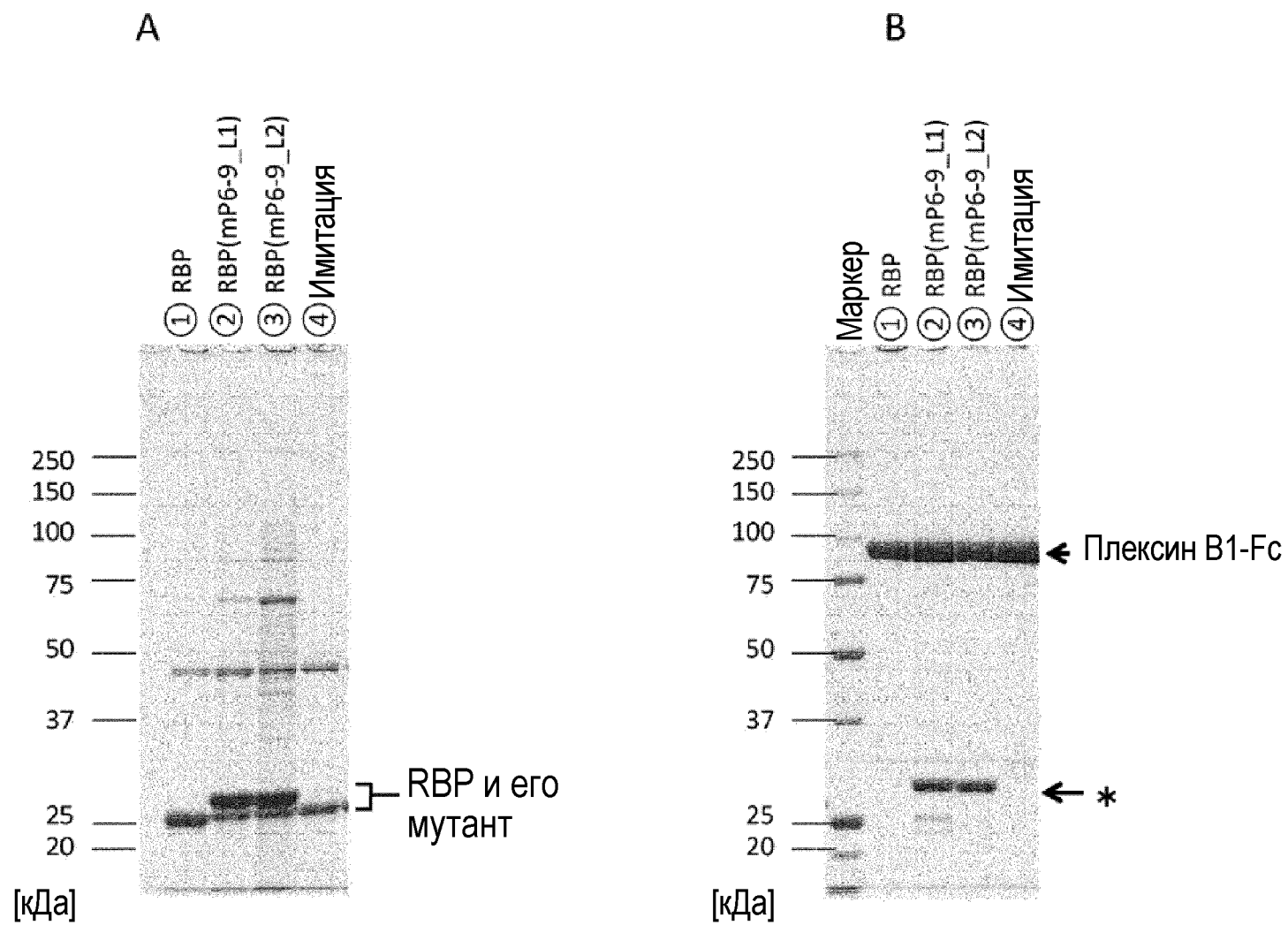
*Полоса слитого белка с циклическим пептидом (мутант hGH)

ФИГ.21



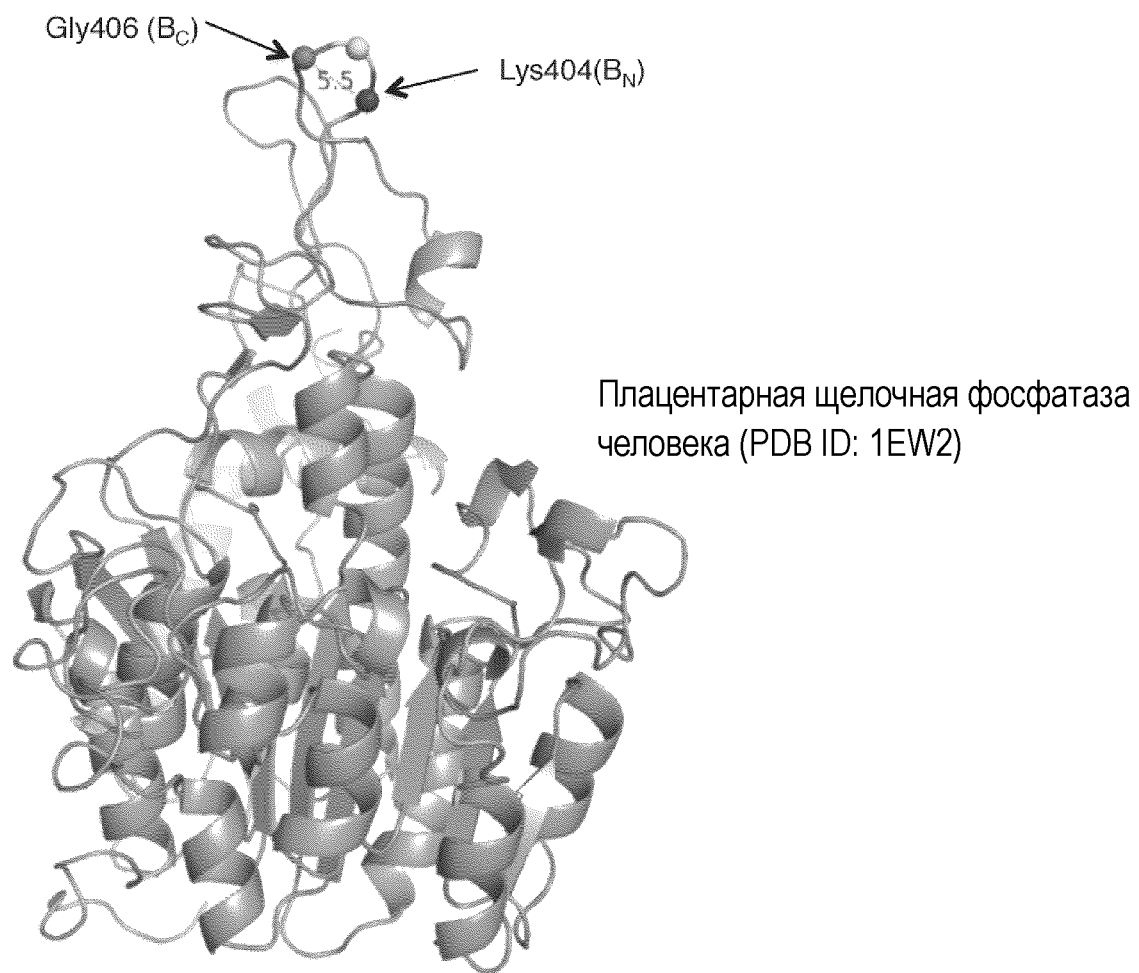
Сывороточный ретинолсвязывающий белок человека (PDB ID: 1JYD)

ФИГ.23

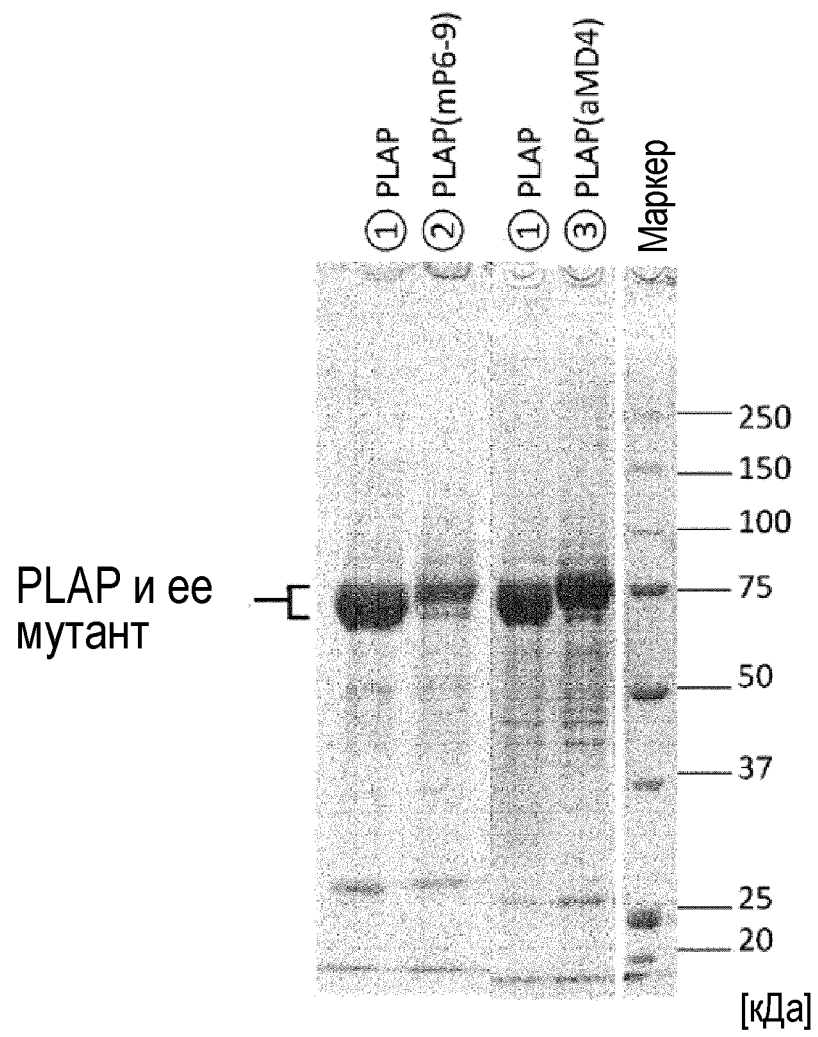


*Полоса слитого белка с циклическим пептидом (мутант RBP)

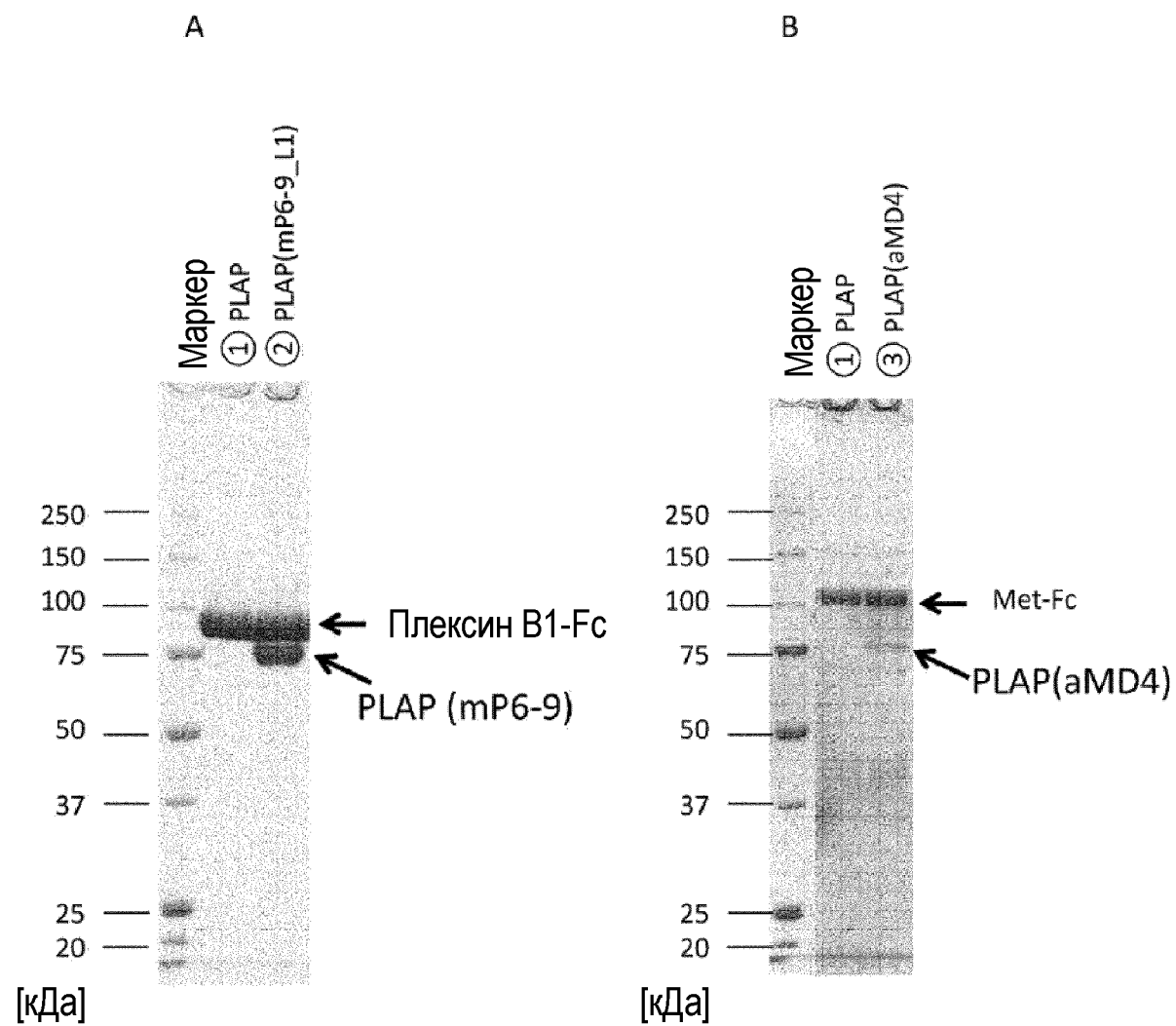
ФИГ.24



ФИГ.26



ФИГ.27

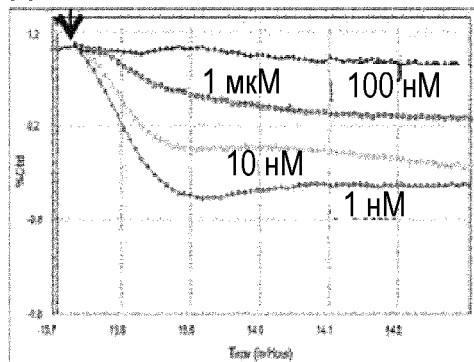


ФИГ.28

Fc(mP6-9_L1)

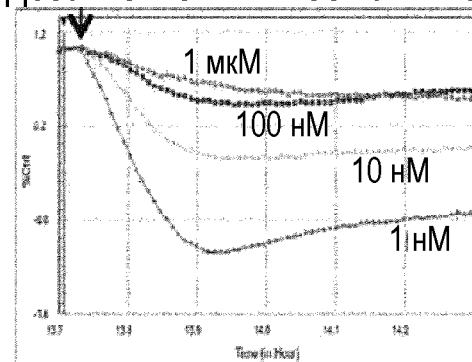
Добавление 1 нМ hSema4D-Fc

Клеточный индекс
(морфологическое
изменение)



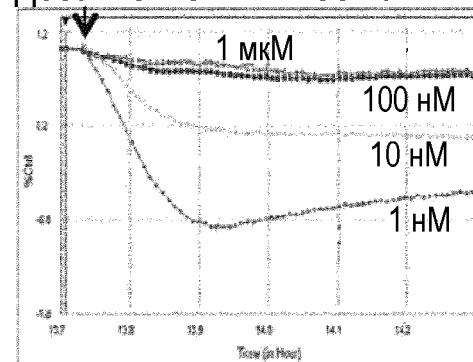
Fc(mP6-9_L2)

Добавление 1 нМ hSema4D-Fc



Fc(mP6-9_L3)

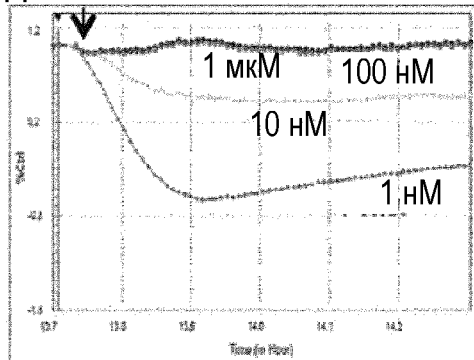
Добавление 1 нМ hSema4D-Fc



Fc(mP6-9_L4)

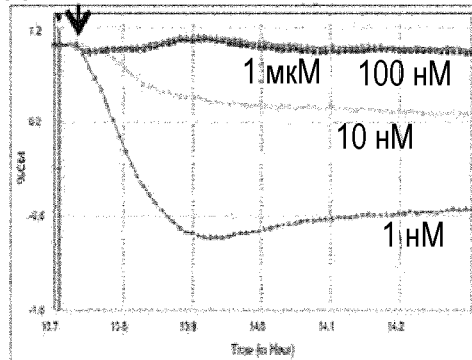
Добавление 1 нМ hSema4D-Fc

Клеточный индекс
(морфологическое
изменение)



Fc(mP6-9_L5)

Добавление 1 нМ hSema4D-Fc



Fc(mP6-9_L6)

Добавление 1 нМ hSema4D-Fc

