

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045689**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.15

(51) Int. Cl. **C12P 21/06 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202091713

(22) Дата подачи заявки
2019.01.15

(54) **БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ**

(31) **10 2018 200 602.4**

(56) EP-A1-2746390
AU-A1-2011253661

(32) **2018.01.15**

(33) **DE**

(43) **2020.11.25**

(86) **PCT/EP2019/050892**

(87) **WO 2019/138125 2019.07.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КУТЦНЕР КРИСТОФ (DE)

(72) Изобретатель:
**Кутцнер Кристоф, Джуман Марко
(DE)**

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

(57) Изобретение относится к слитым полипептидам, молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим указанные слитые полипептиды, и к генетически модифицированным клеткам, включающим указанные молекулы нуклеиновых кислот. Кроме того, изобретение относится к способу получения целевых полипептидов с использованием слитых полипептидов.

B1

045689

045689

B1

Настоящее изобретение относится к слитым полипептидам, молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим указанные слитые полипептиды, и генетически модифицированным клеткам, включающим указанные молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения целевых полипептидов, в частности, целевых пептидов, имеющих аутентичный N-конец, с использованием слитых полипептидов.

Встречающиеся в природе и синтетические пептиды и полипептиды могут использоваться в различных применениях, таких как разработка активных компонентов, в косметической и пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве, исследованиях материалов и асимметричном катализе. На самом деле, практически каждая отрасль промышленности, готовящая или использующая специальные химикаты, имеет к этому отношение. Эти многочисленные функции пептидов стали возможными благодаря их высокому структурному и функциональному разнообразию.

Таким образом, существует острая потребность в разработке простых и эффективных средств, а также способов получения пептидов.

WO 2006/113957 относится к способу рекомбинантного получения гетерологичного полипептида, включающему экспрессию слитого полипептида, причем слитый полипептид содержит мутант аутопротеазы N^{pro} пестивируса и второй полипептид, присоединенный по С-концу, где второй полипептид может расщепляться аутопротеолитически. Кроме того, на N-конце могут присутствовать дополнительные слитые домены, необходимые для связывания с системой аффинной хроматографии, например поли(аминокислоты), такие как метки полилизина или эпитопа, то есть короткие пептидные последовательности, для которых доступно специфическое антитело.

Серьезным недостатком этого способа является необходимость сложных стадий очистки, необходимых для сбора целевого пептида, таких как аффинная хроматография и ВЭЖХ. Для методов аффинной хроматографии требуются дорогостоящие реагенты (например, Ni/NTA, антитела, СефадексTM, имидазол) и большие количества загрязняющих и/или токсичных растворителей. Кроме того, следует учитывать проблемы совместимости домена аутопротеазы. Непреднамеренная активация домена аутопротеазы во время очистки может привести к преждевременному расщеплению и, следовательно, к потере выхода. Кроме того, характеристики целевого пептида, такие как длина, полярность и/или токсичность пептида, могут влиять на активность аутопротеазы и/или конечный выход. Кроме того, пептиды, очищенные с помощью аффинной хроматографии, часто необходимо очищать на дополнительной стадии ВЭЖХ, чтобы достичь желаемой степени чистоты. Таким образом, выход значительно снижается, а экономическая эффективность этих методов еще более ограничивается.

В WO 2008/052387 раскрыты крахмал-связывающие домены и рекомбинантные полипептиды, включающие их, где крахмал-связывающие домены расположены в N-концевом и/или С-концевом направлении целевого полипептида. Слитые полипептиды могут быть очищены хроматографией на крахмальном носителе.

Серьезным недостатком этого способа является то, что очищенные домены не могут быть расщеплены и, таким образом, остаются в целевом пептиде. Эта модификация целевого пептида может привести к непредвиденным и непреднамеренным побочным реакциям при применении пептида.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему в направлении от N-конца к С-концу

- (i) домен очистки,
 - (ii) домен аутопротеазы и
 - (iii) целевой пептидный домен,
- где домен очистки (i) связывается с углеводом.

В дополнительном аспекте изобретение относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, как описано выше, необязательно связанной с последовательностью контроля экспрессии.

Еще в одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к генетически модифицированной клетке, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения целевого пептида, включающему стадии

- (a) предоставления генетически модифицированной клетки, экспрессирующей слитый полипептид, как описано выше,
- (b) культивирования клетки в подходящей культуральной среде и в условиях, подходящих для экспрессии слитого полипептида и для образования телец включения, содержащих слитый полипептид,
- (c) солиubilизации телец включения, содержащих слитый полипептид,
- (d) контактирования солиubilизированного слитого полипептида с матрицей на основе углеводов, обладающей аффинностью к домену очистки (i), в условиях, когда слитый полипептид связывается с матрицей,
- (e) расщепления слитого полипептида с помощью домена аутопротеазы (ii) и высвобождения целевого пептида (iii), и
- (f) сбора целевого пептида (iii).

Настоящее изобретение основано на открытии того факта, что получение целевого пептида с использованием слитого полипептида, содержащего углевод-связывающий домен очистки и аутопротеазы, приводит к значительному упрощению способа получения, например от возможности избежать сложных стадий очистки ВЭЖХ и/или до улучшенного выхода точно процессированного целевого пептида, в частности, целевого пептида с аутентичным N-концом.

В предпочтительном варианте осуществления слитый полипептид содержит домены (i), (ii) и (iii) и, необязательно, N-концевую сигнальную последовательность, с необязательной заменой стартовой аминокислоты домена очистки (i), и/или с линкерной последовательностью, присутствующей между доменами (i) и (ii).

Слитый полипептид по изобретению содержит (i) домен очистки, который связывается с углеводом. Например, домен очистки связывается с олигосахаридом или полисахаридом, в частности, с целлюлозой, хитином и/или крахмалом. Предпочтительно, домен очистки (i) имеет длину от 25 до 2000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 1000 аминокислот и более предпочтительно от 70 до 800 или от 100 до 600 аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления домен очистки связывается с крахмалом. Термин "крахмал" в смысле настоящего изобретения относится к линейному, поперечно-сшитому или циклическому углеводу из α -1,4- и/или α -1,6-связанных единиц глюкозы, такому как например, амилоза, амилопектин, гликоген, декстрин или циклодекстрин. Домен очистки, связывающийся с крахмалом, содержит, например, глюкоамилазу и/или амилазу и/или ее крахмал-связывающий домен, например человеческие амилазы, амилазу, полученную из глюкоамилазы *Aspergillus niger* или производную от *Rhizopus spp*, например, углевод-связывающие модули CBM20, CBM21 и/или CBM26 или их комбинации.

Эндоглюканазу или целлобиазу или ее целлюлозо-связывающий фрагмент можно, например, использовать в качестве домена очистки, связывающегося с целлюлозой. Интеин-хитин-связывающий домен (iCBD) может, например, быть использован в качестве домена очистки, связывающегося с хитином.

В некоторых вариантах осуществления домен очистки (i) согласно настоящему изобретению имеет одну или более из следующих особенностей

(a) он связывается с крахмалом, таким как амилоза, амилопектин, гликоген, декстрин и/или циклодекстрин;

(b) он не содержит ни одного, содержит один или более крахмал-связывающих доменов;

(c) он не содержит ни одного, содержит один или более сайтов связывания с поверхностью для углеводов;

(d) он не содержит ни одного, содержит один или более углевод-связывающих сайтов; или

(e) он обеспечивает комбинацию одной или более особенностей (a)-(d).

Термин "крахмал-связывающий домен" в смысле настоящего изобретения относится к конкретным ключевым молекулам, присутствующим в некоторых ферментах и участвующим в метаболизме полисахаридов. Описано, что эти некаталитические модули необходимы для связывания крахмала и для каталитической активности крахмалсинтазы III (Barchiesi et al., BMC Res Notes 2015, 8, 613).

Термин "сайт связывания с поверхностью" в смысле настоящего изобретения относится к сайту связывания лиганда, который расположен на каталитическом модуле фермента, но вне активного сайта. До настоящего времени сайты связывания с поверхностью наблюдались в кристаллической структуре более 45 углевод-активных ферментов, где приблизительно половина этих ферментов принадлежит семейству GH13 (Cockburn et al., *Biologica* 2014, 69, 705; Rauter and Lindhorst Eds.) *Carbohydrate Chemistry - Chemical and Biological Approaches - Vol. 39, Specialist Periodical Reports*, 2013).

Термин "углевод-связывающий сайт" в смысле настоящего изобретения относится к белковому домену, который присутствует в углевод-активных ферментах, таких как, например, гликозидгидролазы. Большинство этих доменов обладают углевод-связывающей активностью. Углевод-связывающие сайты также называют целлюлозо-связывающими сайтами (Gilkes et al., *Microbiol Rev.* 1991, 55, 303). На основании сходства аминокислотных последовательностей они классифицированы во многих семействах, более 65 из которых известны к настоящему моменту (база данных Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy) www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules; 10 января или 19 Декабрь 2018 г.)

Другим элементом слитого полипептида по изобретению является домен аутопротеазы (ii). Термин "домен аутопротеазы" относится к протеазе, которая расщепляет партнера по слиянию, который связан с ней в заранее определенном сайте. Домен аутопротеазы (ii) может включать вирусную аутопротеазу, предпочтительно аутопротеазу, происходящую из вируса семейства *Flaviviridae*, более предпочтительно аутопротеазу, происходящую из пестивируса, и еще более предпочтительно N^{pro}-аутопротеазу или активный фрагмент или активный мутант такой аутопротеазы. Например, домен аутопротеазы (ii) может содержать N^{pro}-аутопротеазу CSFV (вирус классической чумы свиней), например штамма CSFV Alfort (Gotipatiet et al., *PLoS Pathog* 2013, 9, e1003704; Patron et al., *Vet Microbiol* 2010, 73, 137; Meyers et al., *Virology* 1989, 171,555; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J04358>, 10 января 2018 г.) или мутант N^{pro}-аутопротеазы. Например, может использоваться мутант N^{pro}-аутопротеазы, в котором по меньшей мере один остаток цистеина природной N^{pro}-аутопротеазы заменен другим аминокислотным остатком, где предпочтительные мутанты описаны в WO 2006/113957, которая включена в настоящее описание по-

средством ссылки. Предпочтительными сайтами мутаций являются C112, C134 и C138 природной N^{pro}-аутопротеазы. Конкретным предпочтительным вариантом осуществления является мутант EDDIE, который раскрыт как SEQ ID NO: 5 в WO 2006/113957, который включен сюда посредством ссылки. Также пригодны мутанты N^{pro}-аутопротеаз дикого типа или мутанты N^{pro}-аутопротеаз без мутации одного из присутствующих в них остатков цистеина. Такие мутации могут содержать замену, например, по меньшей мере одной основной аминокислоты на кислую аминокислоту, по меньшей мере одной кислой аминокислоты на основную аминокислоту, по меньшей мере одной гидрофобной аминокислоты на гидрофильную аминокислоту и/или по меньшей мере одной гидрофильной аминокислоты на гидрофобную аминокислоту.

Домен аутопротеазы (i) может расщеплять слитый полипептид после С-конца аутопротеазы и перед N-концом целевого пептида, то есть до начала целевого пептида (iii). Предпочтительно, расщепление происходит таким образом, что аминокислотные остатки домена аутопротеазы (ii) не остаются с целевым пептидом (iii) и получается целевой пептид, имеющий аутентичный N-конец. В дополнительном варианте осуществления остаток цистеина может оставаться на N-конце целевого пептида.

Настоящее изобретение позволяет очищать различные целевые пептиды. Термин "целевой пептид" включает пептидные последовательности длиной 2 или более аминокислот, например, 2-1000 или более аминокислот. Таким образом, целевой пептид может иметь, например, длину цепи (a) 2-100, например, 2-50 аминокислот, (b) 100-500 аминокислот или (c) более чем 500 аминокислот.

Посредством настоящего изобретения могут быть получены различные типы целевых пептидов, в частности, пептиды, которые недоступны или вряд ли доступны обычными методами, такими как рекомбинантный синтез и твердофазный синтез. Пептиды согласно изобретению включают, например, высокогидрофобные целевые пептиды, имеющие количество гидрофобных аминокислот $\geq 10\%$, предпочтительно $\geq 20\%$, более предпочтительно $\geq 30\%$ и еще более предпочтительно $\geq 40\%$ в расчете на общее количество аминокислот целевого пептида, где гидрофобные аминокислоты выбраны из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, пролина, триптофана и фенилаланина. С другой стороны, могут быть также получены высокогидрофильные целевые пептиды, например, с количеством гидрофильных аминокислот $\geq 10\%$, предпочтительно $\geq 20\%$, более предпочтительно $\geq 30\%$, еще более предпочтительно $\geq 40\%$ в расчете на общее количество аминокислот целевого пептида, где гидрофильные аминокислоты выбраны из серина, треонина, глутамина, аспарагина, тирозина, глицина, цистеина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, гистидина, аргинина и лизина. Кроме того, могут быть получены целевые пептиды, имеющие комбинацию гидрофобных и гидрофильных аминокислотных блоков, как описано выше. Например, эти целевые пептиды могут иметь количество гидрофобных аминокислот $\geq 10\%$, предпочтительно $\geq 20\%$, более предпочтительно $\geq 30\%$, еще более предпочтительно $\geq 40\%$ и до 100% в расчете на общее количество аминокислот целевого пептида на более длинных участках, например части, имеющие длину предпочтительно от 2 до 100 аминокислот целевого пептида и количество гидрофильных аминокислот $\geq 10\%$, предпочтительно $\geq 20\%$, более предпочтительно $\geq 30\%$, еще более предпочтительно $\geq 40\%$ и до 100% в расчете на общее количество аминокислот целевого пептида в следующих частях, например, в частях, имеющих предпочтительно от 2 до 100 аминокислот целевого пептида.

Следующим аспектом настоящего изобретения является рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, как описано выше. Молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать в одноцепочечной или двухцепочечной форме, например в виде РНК или ДНК. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК. Необязательно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, функционально связана с последовательностью контроля экспрессии, например, с промотором и/или энхансером, т.е. с последовательностью, которая обеспечивает экспрессию в клетке-хозяине. Например, последовательность контроля экспрессии может содержать аутоиндуцируемый, химически и/или термически индуцируемый промотор, который обеспечивает целевой контроль экспрессии.

Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может быть расположена в векторе, то есть в конструкции нуклеиновой кислоты, которая может быть введена в клетку-хозяин. Типичными векторами являются вирусные векторы, плазмиды и космиды, подходящие для введения в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяин. Предпочтительно, вектор представляет собой плазмиду, в частности, плазмиду, подходящую для введения в прокариотическую клетку-хозяин.

Необязательно, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид, контролирующую тип экспрессии слитого полипептида в клетке-хозяине. Предпочтительно, присутствует последовательность, кодирующая сигнальный пептид, контролирующая экспрессию в форме нерастворимых телец включения в клетке-хозяине. Примерная подходящая сигнальная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, кодирующая последовательность сигнального пептида заменяет стартовый кодон домена очистки (i). Кроме того, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты необязательно может иметь последовательность, кодирующую линкер, между доменом очистки (i) и доменом аутопротеазы (ii). Длина линкера может составлять 1-50 или более аминокислот. В другом варианте осуществления домены (i) и

(ii) слиты напрямую, то есть без линкера. В предпочтительном варианте осуществления последовательность гена, кодирующая слитый полипептид, имеет дополнительный сайт клонирования, например сайт узнавания фермента рестрикции на 3'-конце домена аутопротеазы (ii). Например, дополнительный сайт клонирования может быть введен молчащей мутацией, то есть мутацией последовательности ДНК без какого-либо воздействия на аминокислотную последовательность, и может содержать кодоны 2 и 3, например, от направления С-конца домена аутопротеазы. Кроме того, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты может включать дополнительный стоп-кодон на С-конце, например кодон ТАА.

Генетически модифицированная клетка согласно изобретению включает молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше, предпочтительно молекулу нуклеиновой кислоты, расположенную в векторе и предпочтительно способную экспрессировать слитый полипептид, в частности, в форме нерастворимых телец включения, но также в растворимой форме. Генетически модифицированная клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой, предпочтительно прокариотической клеткой, например, грамотрицательной бактериальной клеткой, такой как клетка *E.coli*, или грамположительной бактериальной клеткой, такой как клетка *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis*. С другой стороны, клетка также может представлять собой эукариотическую клетку, например дрожжевую клетку, клетку насекомого или клетку млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения целевого пептида. Этот способ включает стадии:

- (a) предоставления генетически модифицированной клетки, экспрессирующей слитый полипептид, как описано выше,
- (b) культивирования клетки в подходящей культуральной среде и в условиях, подходящих для экспрессии слитого полипептида и для образования телец включения, содержащих слитый полипептид,
- (c) солюбилизации телец включения, содержащих слитый полипептид,
- (d) контактирования солюбилизованного слитого полипептида с матрицей на основе углеводов, обладающей аффинностью к домену очистки (i), в условиях, когда слитый полипептид связывается с матрицей,
- (e) расщепления слитого полипептида с помощью домена аутопротеазы (ii) и высвобождения целевого пептида (iii), и
- (f) сбора целевого пептида (iii).

Стадия (a) включает получение генетически модифицированной клетки, экспрессирующей слитый полипептид. Такая клетка может быть получена путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, включающей последовательность, кодирующую слитый полипептид, в частности, в форме вектора, в клетку известными способами, такими как, например, трансфекция или трансформация. На стадии (b) клетки культивируют в подходящей культуральной среде, например, в культуральной среде, обычно используемой для соответствующего типа клеток. Культивирование происходит в условиях, когда происходит экспрессия слитого полипептида и образование телец включения, содержащих слитый полипептид. Например, индуцируемый промотор, например, аутоиндуцируемый, химически или термически индуцируемый промотор может быть использован для контроля экспрессии слитого полипептида. Стадия (c) включает солюбилизацию телец включения, содержащих слитый полипептид, предпочтительно после отделения от других клеточных компонентов. Солюбилизация телец включения может быть выполнена с использованием буфера, содержащего большое количество хаотропных веществ, таких как мочевины и/или гидрохлорид гуанидина.

На стадии (d) солюбилизованный слитый полипептид приводят в контакт с матрицей на основе углеводов, обладающей аффинностью к домену очистки (i), так что слитый полипептид связывается с матрицей посредством своего домена очистки. Например, может быть выполнена хроматография слитого полипептида с использованием матрицы, например, с использованием колонки, содержащей матрицу. Эта стадия выполняется в условиях, когда домен аутопротеазы (ii) неактивен, чтобы избежать преждевременного расщепления целевого пептидного домена (iii). В этих условиях количество расщепленного слитого полипептида предпочтительно составляет $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 3\%$ или $\leq 1\%$. Условия, при которых присутствует "неактивный домен аутопротеазы", представляют собой (1) условия, при которых домен аутопротеазы естественным образом неактивен и активируется только при изменении условий окружающей среды, таких как изменение температуры, pH и/или ионная сила; или (2) условия, при которых домен аутопротеазы является естественным образом активным, однако он не обладает достаточной активностью для достижения преждевременного расщепления целевого пептидного домена в течение периода времени, необходимого для выполнения стадии (d) способа, то есть кинетически неактивен, например, в течение до 10 мин, до 20 мин или до 30 мин, в течение которых происходит связывание слитого полипептида с матрицей и отделение примесей.

В конкретном варианте осуществления стадию (d) проводят в нативных условиях, то есть в условиях, когда аутопротеаза является естественным образом активной. Неожиданно было обнаружено, что даже если слитый полипептид присутствует в своем нативном состоянии, домен аутопротеазы остается достаточно неактивным во время стадии (d), обеспечивая тем самым условия, при которых слитый полипептид может быть очищен при контакте с углеводной матрицей, обладающей аффинностью к домену очистки (i),

при этом избегая потери выхода из-за непреднамеренного отделения преждевременно расщепленного целевого пептида вместе с примесями. Предпочтительно на стадии (d) используется нерастворимая матрица, которая облегчает отделение примесей.

На стадии (e) слитый полипептид расщепляется доменом аутопротеазы (ii), в результате чего высвобождается целевой пептид (iii). Расщепление слитого полипептида может быть результатом добавления буфера для аутопротеолиза, то есть буфера, обеспечивающего условия, при которых аутопротеаза активна, например, кислотные или щелочные условия. В одном варианте осуществления расщепление слитого полипептида происходит в результате изменения значения pH, например, путем добавления кислого буфера для аутопротеолиза, имеющего $pH \leq 5$, $\leq 4,5$ или ≤ 4 , или путем добавления щелочного буфера для аутопротеолиза, имеющего $pH > 7$, $\geq 7,3$ или $\geq 7,5$. В таких условиях получают целевой пептид (iii) с N-концевым остатком цистеина, в случае использования слитого полипептида с C-концевым остатком цистеина в аутопротеазном домене (ii).

Наконец, на стадии (f) собирают целевой пептид (iii), предпочтительно содержащей отделение от матрицы и остатков связанного с ней слитого полипептида и/или выделение целевого пептида, например, осаждением и/или центрифугированием. Предпочтительно, стадия (f) включает осаждение целевого пептида в органическом растворителе, например, в спирте или в смеси растворителей. Гидрофобные пептиды могут быть необязательно экстрагированы растворителем или смесью растворителей, которые не смешиваются с водой. Собранный целевой пептид может иметь аутентичный N-конец или N-концевой остаток цистеина.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения целевого пептида, включающему стадии

(a') предоставления генетически модифицированной клетки, экспрессирующей слитый полипептид, как описано выше,

(b') культивирования клетки в подходящей культуральной среде и в условиях, подходящих для экспрессии слитого полипептида в растворимой форме,

(c') контактирования слитого полипептида с матрицей на основе углеводов, обладающей аффинностью к домену очистки (i), в условиях, когда слитый полипептид связывается с матрицей,

(d') расщепления слитого полипептида доменом аутопротеазы (ii) и высвобождения целевого пептида (iii), и

(e') сбора целевого пептида (iii).

Стадия (a') включает получение генетически модифицированной клетки, экспрессирующей слитый полипептид. Такая клетка может быть получена путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, включающей последовательность, кодирующую слитый полипептид, в частности в форме вектора, в клетку известными способами, такими как трансфекция или трансформация. На стадии (b') клетки культивируют в подходящей культуральной среде, например, в культуральной среде, обычно используемой для соответствующего типа клеток. Культивирование происходит в условиях, когда происходит экспрессия слитого полипептида в растворимой форме. Например, индуцируемый промотор, например, аутоиндуцируемый, химически или термически индуцируемый промотор может быть использован для контроля экспрессии слитого полипептида.

В этом варианте осуществления слитый полипептид с аутопротеазным доменом (ii) является естественно неактивным в условиях экспрессии в клетке-хозяине и/или в культуральной среде и не активируется до определенной адаптации условий окружающей среды, например, активируется путем добавления активирующего вещества и/или предпочтительно используется адаптация pH. Например, активация может быть выполнена путем регуляции кислотного или щелочного pH, как описано выше.

Стадии (c')-(e') могут выполняться в соответствии со стадиями (d)-(f) вышеописанного варианта осуществления.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения целевого пептида, включающему стадии

(a'') предоставления генетически модифицированной клетки, секретирующей слитый полипептид, как описано выше,

(b'') культивирования клетки в подходящей культуральной среде и в условиях, подходящих для секреции слитого полипептида,

(c'') контактирования слитого полипептида с матрицей на основе углеводов, обладающей аффинностью к домену очистки (i), в условиях, когда слитый полипептид связывается с матрицей,

(d'') расщепления слитого полипептида доменом аутопротеазы (ii) и высвобождения целевого пептида (iii), и

(e'') сбора целевого пептида (iii).

Стадия (a'') включает предоставление генетически модифицированной клетки, секретирующей слитый полипептид. Такая клетка может быть получена путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, включающей последовательность, кодирующую слитый полипептид, и сигнальную последовательность, индуцирующую секрецию, в частности, в форме вектора, в клетку известными способами, такими как

трансфекция или трансформация. На стадии (b") клетку культивируют в подходящей культуральной среде, например, в культуральной среде, обычно используемой для соответствующего типа клеток. Культивирование происходит в условиях, при которых происходит секреция слитого полипептида. Например, индуцируемый промотор, например, аутоиндуцируемый, химически или термически индуцируемый промотор может быть использован для контроля секреции слитого полипептида.

В этом варианте осуществления слитый полипептид с аутопротеазным доменом (ii) является естественно неактивным в условиях секреции в культуральной среде и не активируется до определенной адаптации условий окружающей среды, например, активируется путем добавления активирующего вещества и/или предпочтительно используется адаптация pH. Например, активация может быть выполнена путем регуляции кислотного или щелочного pH, как описано выше.

Стадии (c")-(e") могут выполняться в соответствии со стадиями (d)-(f) вышеописанного варианта осуществления.

Еще в одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, содержащий домены (i) и (ii), как описано выше, и сайт клонирования для включения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей домен (iii), в виде, описанном выше, необязательно, функционально связанной с последовательностью контроля экспрессии. Эта молекула нуклеиновой кислоты является исходным материалом для получения любого целевого пептида, поскольку молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такой целевой пептид, может быть клонирована стандартными методами, такими как рестрикционное расщепление и последующее лигирование. Эта молекула нуклеиновой кислоты также может быть расположена в векторе, как описано выше, например, в плазмиде.

Более того, настоящее изобретение должно быть описано более подробно с помощью следующих примеров.

Пример 1. Конструирование последовательностей генов, кодирующих слитый полипептид.

Были получены последовательности генов, кодирующих слитый полипептид, содержащий три части. N-концевая часть состоит из домена очистки (i), средняя часть состоит из домена N^{pro}-аутопротеазы (ii), а C-концевая часть состоит из целевого пептидного домена (iii). Домены (i) и (ii) необязательно связаны с линкером (SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4).

α -амилаза человека (AMY1 c; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6), глюкоамилаза 1 (GA1), полученная из *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8), а также связывающиеся с углеводами единицы CBM20 (SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10) и CBM26 использовали в качестве домена очистки.

N^{pro} (CSFV Alfort187, SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12), а также мутант N^{pro} EDDIE (SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14) в соответствии с WO 2006/113957 использовали в качестве домена аутопротеазы.

Окисленная по метионину-35 форма амилоида- β (1-42), гептамерный пептид валина (Val₇), гидрофобный пептид Ile₁₃Thr₈ и известный зеленый флуоресцентный белок (GFP) были использованы в качестве целевых пептидов.

Пример 2. Приготовление целевых пептидов.

Последовательности генов, описанные в примере 1, были экспрессированы в генетически модифицированных клетках-хозяевах.

На первой стадии в клетку-хозяина вводили вектор (например, вектор pet28a(+)), содержащий соответствующую последовательность гена, например *E.coli*, BL21 DE 3. Последовательность гена расположена в этом векторе под контролем индуцируемого изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) *lac*-промотора. Клетки, содержащие вектор, были отобраны, например, путем посева на чашки с агарозой, содержащей канамицин. Колонии на этой чашке были использованы для экспрессии.

Бактериальные клетки культивировали в стандартных условиях в подходящей культуральной среде, например среде LB, пока не была достигнута оптическая плотность OD₆₀₀ 0,6. Для этого индукцию экспрессии гена осуществляли при 37°C в течение 12 ч путем добавления IPTG (конечная концентрация 1 мМ).

После экспрессии клетки собирали центрифугированием, смешивали с буфером для лизиса (например, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭДТА, 75 мМ NaOAc, 20 мМ HEPES pH 7,3) и разрушали ультразвуком. Слитый полипептид продуцировался во время фазы экспрессии в форме телец включения (IV) внутри клеток и, таким образом, присутствовал в нерастворимой и кристаллической форме внутри клеток. Затем IV солибилизовали в солибилизирующем буфере (например, 8 М мочевины, 6 М гуанидиний HCl, 20 мМ HEPES, 50 мМ дитиотреитол, pH 7,3), предпочтительно в восстанавливающих условиях для дальнейшей обработки. 10-30 мл буфера использовали для клеточной массы, полученной из 1 л культуры.

В денатурирующем буфере аутопротеазный домен слитого полипептида неактивен. Для превращения в нативную конформацию и, таким образом, для очистки и активации аутопротеазы, раствор солибализованных IV добавляли к суспензии аутопротеолиза (например, 0,5 М аргинина, 100 мМ HEPES, 10 мМ сахарозы, 5 мМ ЭДТА, pH 7,3) и крахмала, например, кукурузного крахмала. Другие источники крахмала также подходят. При этом слитый белок связывался с крахмалом своим доменом очистки (амилаза, глюкоамилаза или крахмал-связывающий домен).

Затем слитый белок инкубировали в суспензии буфера для аутопротеолиза и крахмала в течение

10 мин при 37°C при постоянном перемешивании. Затем суспензию центрифугировали и супернатант сливали. Центрифугат ресуспендировали в воде два или более раз и повторно центрифугировали. Соответствующие супернатанты отбрасывали. Таким образом, возможные примеси были удалены. На следующем этапе центрифугат ресуспендировали в буфере для аутопротеолиза и хранили при 8°C в течение 60 мин. После ресуспендирования и последующего центрифугирования супернатант осаждали в спирте и снова центрифугировали. Таким образом был получен целевой пептид, который можно лиофилизировать и, таким образом, сделать пригодным для хранения.

В случае, когда целевой пептид представляет собой нерастворимый в воде пептид или белок (например, амилоид-β-пептид), крахмал повторно экстрагируют в подходящем растворителе (таком как гексафторизопропанол, HFIP) до осаждения в спирте, центрифугируют и затем осаждают.

Пример 3. Характеристика целевых пептидов.

Идентичность целевых пептидов, полученных в примере 2, была подтверждена спектроскопическим и спектрометрическим методами.

На фиг. 1 изображен спектр MALDI-TOF амилоида-β (1-42), окисленного по метиониновому остатку 35 (+ 16 Да). Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода (1:1, 0,1% трифторуксусная кислота (TFA)) и совместно кристаллизовали с 2,5-дигидроксibenзойной кислотой (DHB) в качестве матрицы (10 мг/мл) в соотношении 1:50. Измерение проводили при 100 Гц с помощью 1000 лазерных импульсов.

На фиг. 2 изображен MALDI-TOF спектр Ile₁₃Thr₈. Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода 1:1, 0,1% TFA и совместно кристаллизовали с DHB в виде матрицы (10 мг/мл) в соотношении 1:50. Измерение проводили при 100 Гц с помощью 1000 лазерных импульсов. Были обнаружены два сигнала, соответствующих Ile₁₃Thr₈ (M/Z=2) и Ile₁₃Thr₈+Na (M/Z=2).

На фиг. 3 изображен спектр флуоресцентного излучения GFP при длине волны возбуждения 485 нм и обнаруженной длине волны излучения 510 нм.

Пример 4. Приготовление целевых пептидов.

Последовательности генов в соответствии с примером 1 с целевым пептидом Ile₁₃Thr₈, Val₇, мелитином или GFP были введены в клетки-хозяева, а слитые полипептиды были экспрессированы в соответствии с Примером 2.

После экспрессии клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере для лизиса (например, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭДТА, 75 мМ NaOAc, 20 мМ HEPES pH 7,5) в соотношении, например, 1:10 (масс./об.) и разрушали ультразвуком. Во время фазы экспрессии слитые полипептиды продуцировались в форме телец включения (IB) внутри клеток. IB растворяли в солюбилизирующем буфере (например, 8 М мочевины, 6 М гуанидиний HCl, 20 мМ HEPES, 50 мМ дитиотреитола, pH 7,5), предпочтительно в восстанавливающих условиях для дальнейшей обработки, например, 40 мин при комнатной температуре. 10-30 мл буфера использовали для клеточной массы, полученной из 1 л культуры.

В солюбилизирующем буфере аутопротеазный домен слитого полипептида неактивен. Для преобразования в нативную конформацию и, таким образом, для очистки и активации аутопротеазы раствор солюбилизованных IB добавляли к суспензии буфера для аутопротеолиза (например, 5 М аргинина, 1,7 М HEPES, 1,6 мМ сахарозы, pH 7,5) и крахмала, например кукурузного крахмала. Другие источники крахмала также подходят. При этом слитый белок связывался с крахмалом своим доменом очистки (амилаза, глюкоамилаза или крахмал-связывающий домен).

Затем слитый белок инкубировали в суспензии буфера для аутопротеолиза и крахмала в течение 10 мин при 37°C при постоянном перемешивании. Затем суспензию центрифугировали и супернатант сливали. Центрифугат ресуспендировали в воде два или более раз и повторно центрифугировали. Соответствующие супернатанты отбрасывали. Таким образом, возможные примеси были удалены. На следующей стадии центрифугат ресуспендировали в буфере для аутопротеолиза (1,2 мл буфера на 100 мг центрифугата) и хранили при 37°C в течение 30 мин при постоянном перемешивании. После последующего центрифугирования супернатант осаждали в спирте, предпочтительно в этаноле, и снова центрифугировали. Таким образом, был получен целевой пептид, который можно лиофилизировать и, таким образом, сделать пригодным для хранения.

В случае, когда целевой пептид представляет собой нерастворимый в воде пептид или белок (например, амилоид-β-пептид), крахмал повторно экстрагируют в подходящем растворителе (таком как HFIP) до осаждения в спирте, центрифугируют и затем осаждают.

Пример 5. Характеристика целевых пептидов.

Идентичность целевых пептидов, полученных в примере 4, была подтверждена спектроскопическим и спектрометрическим методами.

На фиг. 4 изображен MALDI-TOF спектр Ile₁₃Thr₈. Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода 1:1, 0,1% TFA (100 мкг/мл) и совместно кристаллизовали с DHB в качестве матрицы. Измерение проводили в режиме положительного отражателя. Были обнаружены два сигнала: m/z=1148 (ср.), соответствующий Ile₁₃Thr₈ (M+2, H); и m/z=1160, что соответствует Ile₁₃Thr₈ + (M+2, Na).

На фиг. 5 изображен MALDI-TOF спектр Val₇. Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода 1:1, 0,1% TFA (100 мкг/мл) и совместно кристаллизовали с DHB в качестве матрицы. Измерение проводили в

режиме положительного отражателя. Был обнаружен один сигнал: $m/z=712$ (ср.), соответствующий Val₇ (M+1, H).

На фиг. 6 изображен MALDI-TOF спектр мелиттина. Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода 1:1, 0,1% TFA (100 мкг/мл) и совместно кристаллизовали с DHB в качестве матрицы. Измерение проводили в режиме положительного отражателя. Был обнаружен единственный сигнал: $m/z=2843$ (ср.), соответствующий мелиттину (M+1, H).

На фиг. 7 представлены УФ-спектры мелиттина при 286 нм (триптофан) после очистки ВЭЖХ (скорость потока 2 мл/мин, линейный градиент 5-80%, буфер В в течение 20 мин, буфер А: вода, 0,1% TFA, буфер В: ацетонитрил/вода 80:20+0,1% TFA; концентрация образца 1 мг/мл)

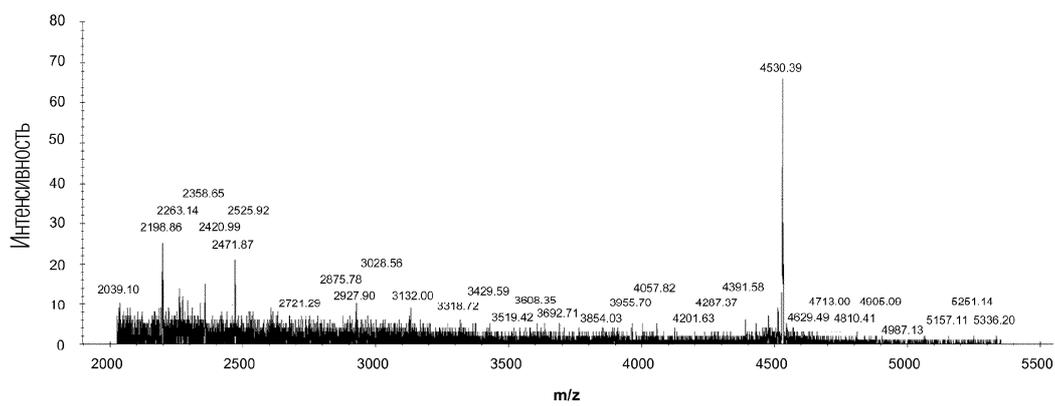
На фиг. 8 изображен спектр флуоресцентного излучения GFP (10 мг/мл) при длине волны возбуждения 395 нм. Единственная полоса излучения была обнаружена при длине волны 509 нм.

На фиг. 9 изображен MALDI-TOF спектр амилоида-β (1-42). Образец растворяли в смеси ацетонитрил/вода 1:1, 0,1% TFA (100 мкг/мл) и совместно кристаллизовали с DHB в качестве матрицы. Измерение проводили в режиме положительного отражателя. Был обнаружен единственный сигнал: $m/z=4512$ (ср.), соответствующий амилоиду-β (1-42) (M+1, H).

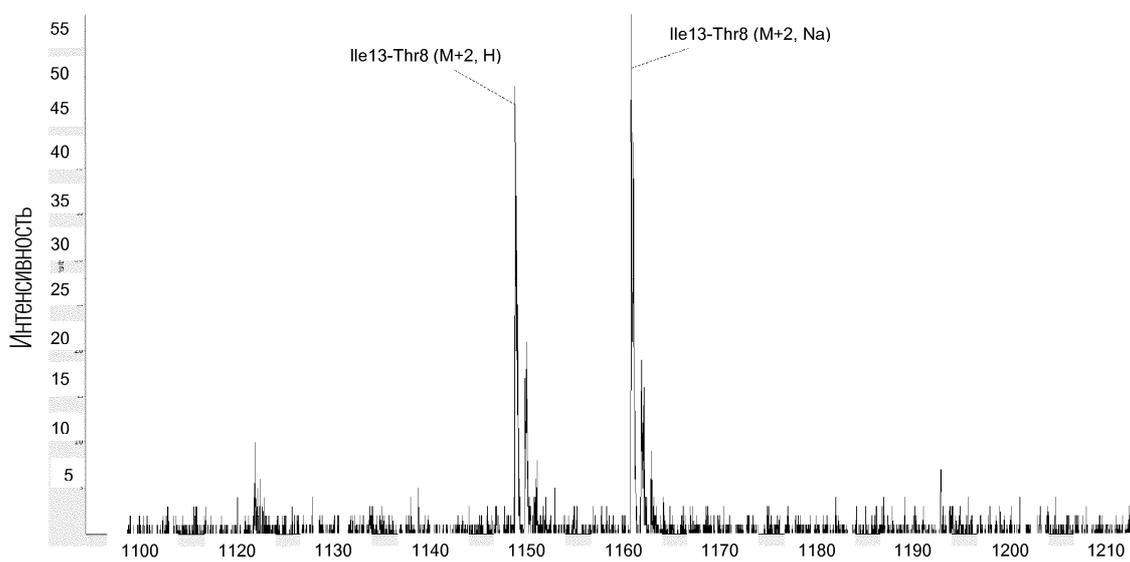
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу:
 - (i) домен очистки,
 - (ii) домен аутопротеазы и
 - (iii) целевой пептидный домен,
 где домен очистки (i) связывается с целлюлозой, хитином и/или крахмалом и содержит глюкоамилазу и/или амилазу, и
 - где домен аутопротеазы (ii) содержит мутант EDDIE вируса классической чумы свиней (CSFV) N^{pro}, где мутант EDDIE CSFV N^{pro} содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и где домен аутопротеазы (ii) расщепляет слитый полипептид после C-конца аутопротеазы (ii) и перед N-концом целевого пептидного домена (iii).
2. Слитый полипептид по п.1, отличающийся тем, что целевой пептидный домен (iii) имеет длину цепи, составляющую
 - (a) 2-1000 аминокислот,
 - (b) 100-500 аминокислот или
 - (c) более чем 500 аминокислот.
3. Слитый полипептид п.1, отличающийся тем, что целевой пептидный домен (iii) имеет количество:
 - (a) гидрофобных аминокислот $\geq 10\%$,
 - (b) гидрофильных аминокислот $\geq 10\%$ или
 - (c) комбинацию (a) и (b).
4. Рекombинантная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый полипептид по п.1.
5. Рекombинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.4, где нуклеотидная последовательность функционально связана с последовательностью контроля экспрессии.
6. Вектор, содержащий рекombинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.4.
7. Выделенная генетически модифицированная клетка, включающая рекombинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.4, причем клетка представляет собой прокариотическую или эукариотическую клетку.
8. Способ получения целевого пептида, включающий стадии:
 - (a) предоставление выделенной генетически модифицированной клетки по п.7,
 - (b) культивирование клетки в подходящей культуральной среде и в условиях, подходящих для экспрессии слитого полипептида и для образования телец включения, содержащих слитый полипептид,
 - (c) солюбилизация телец включения, содержащих слитый полипептид,
 - (d) контактирование солюбилизованного слитого полипептида с матрицей на основе углеводов, содержащей целлюлозу, хитин и/или крахмал, в условиях, когда домен очистки (i) слитого полипептида связывается с матрицей,
 - (e) расщепление слитого полипептида с помощью домена аутопротеазы (ii) и высвобождение целевого пептида (iii),
 - (f) сбор целевого пептида (iii).
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что контактирование (d) включает хроматографию на указанной матрице.
10. Способ по п.8, отличающийся тем, что расщепление (e) происходит вследствие добавления буфера для аутопротеолиза, и/или где сбор (f) включает отделение и/или выделение целевого пептида из матрицы.
11. Способ по п.8, отличающийся тем, что целевой пептид (iii), собранный на стадии (f), имеет ау-

тентичный N-конец или остаток цистеина на N-конце.

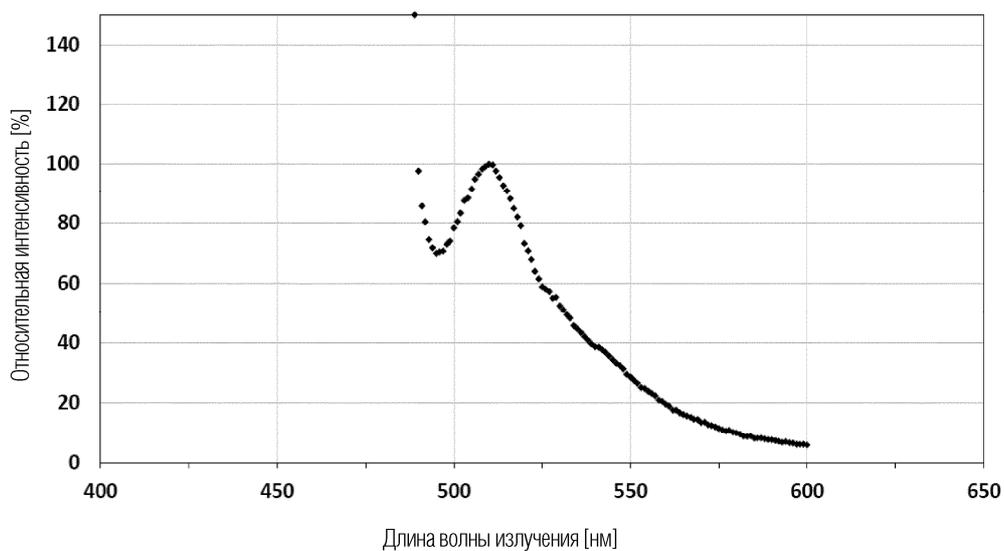


Фиг. 1



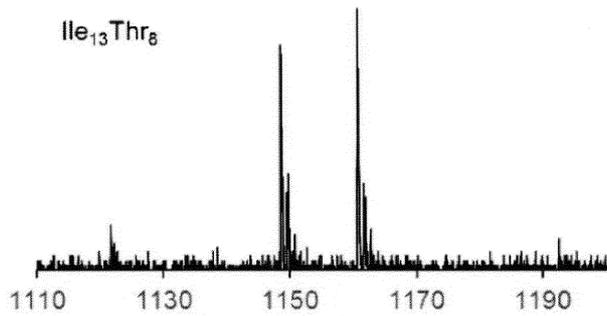
Фиг. 2

Зеленый флуоресцентный белок (длина волны возбуждения 485 нм)

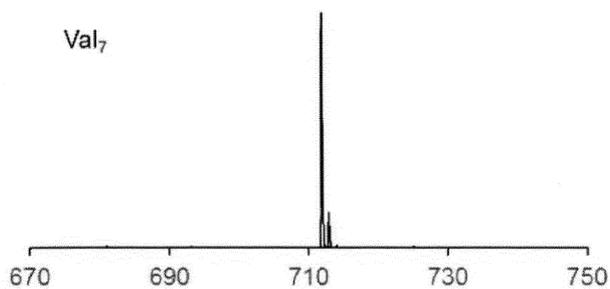


Фиг. 3

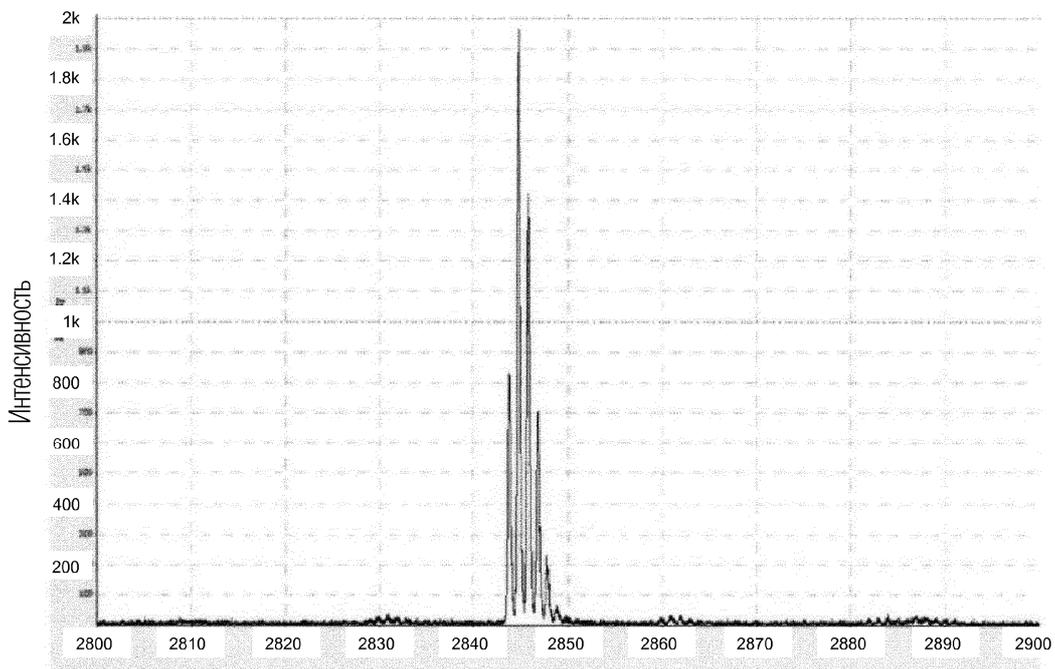
045689



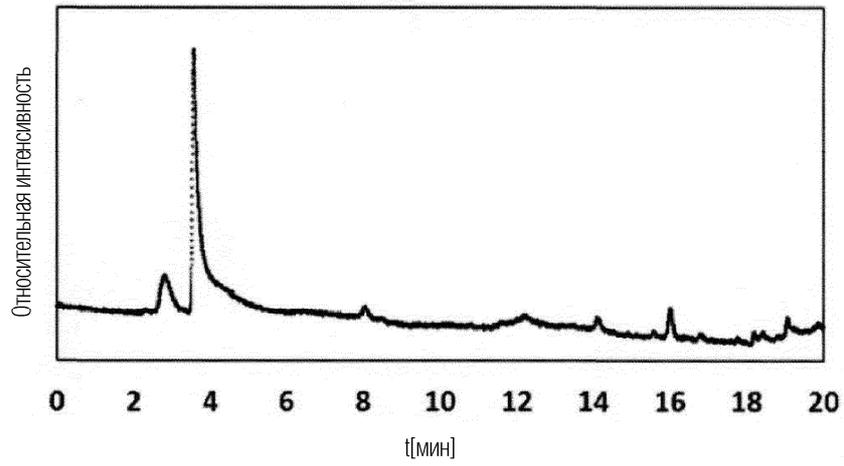
m/z
Фиг. 4



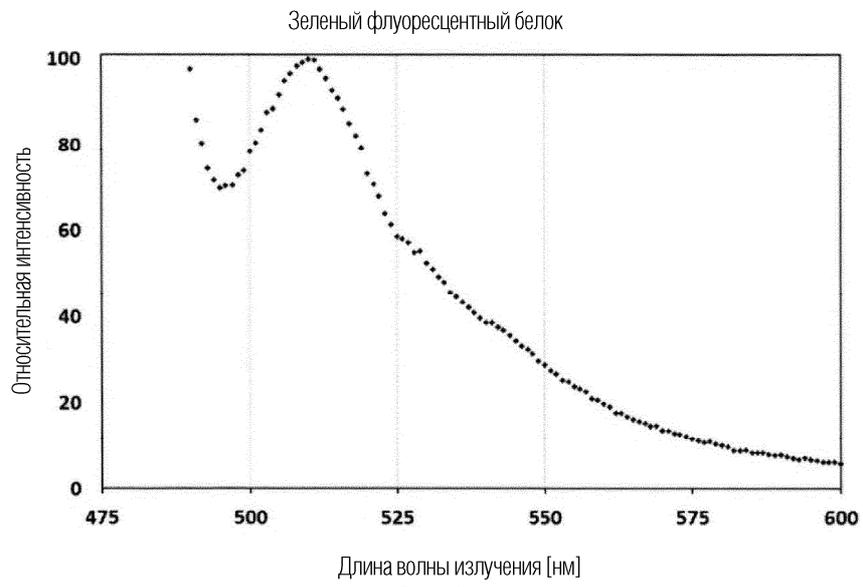
m/z
Фиг. 5



m/z [Th]
Фиг. 6

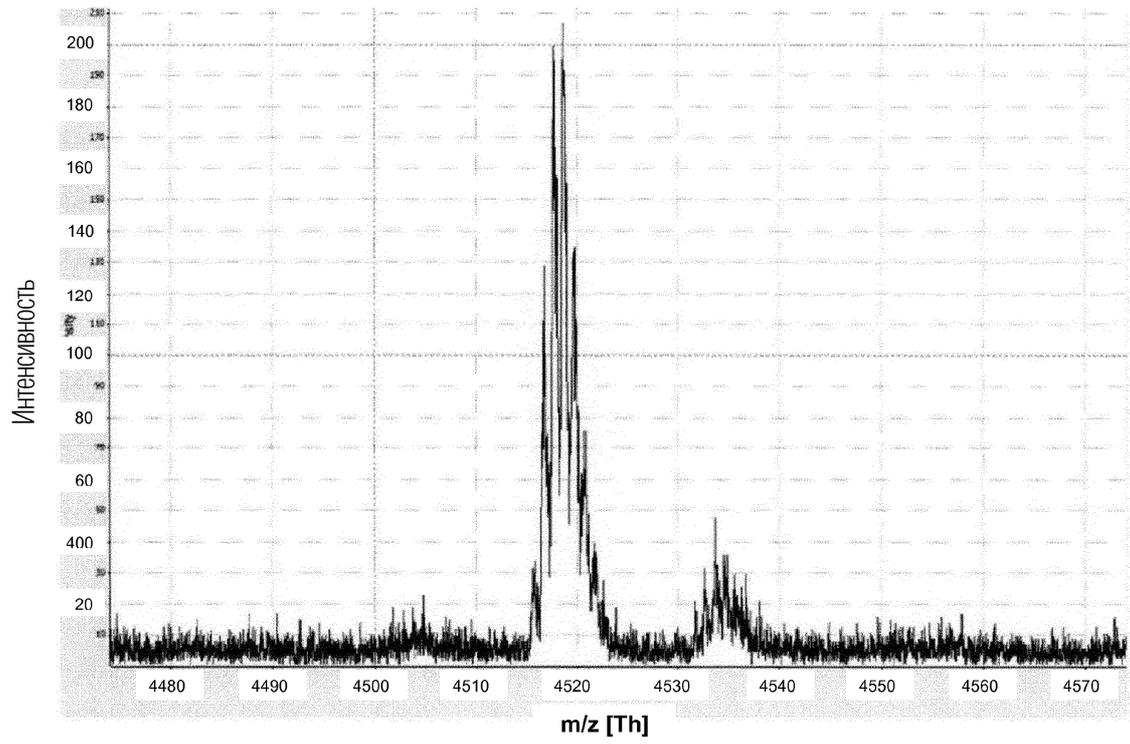


Фиг. 7



Фиг. 8

045689



Фиг. 9



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