

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036487

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.16

(21) Номер заявки
201590136

(22) Дата подачи заявки
2013.05.23

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

(54) ИСКУССТВЕННЫЙ АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН И СОДЕРЖАЩИЙ ЕГО
СЛИТЫЙ БЕЛОК ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОАКТИВНОГО АГЕНТА

(31) 61/651,642; 61/776,918

(32) 2012.05.25; 2013.03.12

(33) US

(43) 2016.02.29

(86) PCT/US2013/042429

(87) WO 2013/177398 2013.11.28

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

(72) Изобретатель:
Джекобс Стивен (US)

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

(56) US-A-6162903

US-A1-20120100165

LEJON, S. et al. Structural Basis For The Binding Of Naproxen To Human Serum Albumin in The Presence Of Fatty Acids And The GA Module. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology And Crystallization Communications. 01 February 2008; Vol. 64, No.2, pp 64-69; page 64, Introduction, first paragraph; page 64, third paragraph to page 65, left column, first paragraph; page 65, right column, second paragraph; DOI:10.1107/S174430910706770X; and accompanying NCBI Submission, Accession 2VDB B GI:168988719, Deposited 04 October 2007, <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=62694>

(57) Изобретение относится к выделенному искусственному альбумин-связывающему домену, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21-34, а также к содержащему его слитому белку для доставки биоактивного агента.

036487

B1

036487
B1

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к альбумин-связывающим доменам и способам их получения и применения. В частности, настоящее изобретение относится к искусственной консенсусной последовательности альбумин-связывающих доменов и ее вариантам, представленным в настоящем документе.

Уровень техники настоящего изобретения

Быстрое выведение биотерапевтических молекул через почечный клиренс приводит к ограниченной клинической эффективности или необходимости в учащении дозировки для пациента. Из-за клубочковой фильтрации почечный клиренс чаще всего связывают с малыми биотерапевтическими молекулами, так как для молекул с молекулярной массой выше 50000 Да скорость фильтрации в почках сильно снижается (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011 г.). Несколько разрешенных к применению биотерапевтических лекарственных средств содержат активные части, которые сами по себе оказываются меньше предела фильтрации и, таким образом, быстро выводятся. Чтобы преодолеть это ограничение, внедрен ряд технологий, которые эффективно увеличивают размер терапевтической молекулы для снижения фильтрации в почках и получаемого в результате периода полужизни.

Пегилирование (ПЭГ) лекарственных средств является эффективным способом увеличения гидродинамического радиуса белка и снижения клубочковой фильтрации. Одну или несколько цепей ПЭГ можно связать с белком, чаще всего с помощью конъюгации к свободным тиоловым или аминным группам на поверхности белка. Пегилированные варианты аденозиндеаминазы, L-аспарагиназы, интерферона альфа-2b, Г-КСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора), гормона роста человека, эритропоэтина, уриказы и фрагмента анти-ФНО-альфа-антител были все разрешены к применению для лечения людей (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011 г.). Ограничения пегилирования включают формирование неоднородных продуктов и сложности в контроле числа молекул ПЭГ, прикрепленных к определенным белкам. Пегилирование вводит дополнительные стадии конъюгации и очистки в производство терапевтических белков, приводя в итоге к уменьшению выхода и увеличению стоимости продукции. Пегилирование может также приводить к почечной трубчатой вакуолизации у животных и у пациентов, так как цепи ПЭГ не распадаются в почках (Gaber-Porekar et al., Curr Opin Drug Discov Devel 11:242-250, 2008 г.).

Для увеличения периода полужизни терапевтических молекул в сыворотке можно применять связывание лекарственного средства с Fc-участком антитела для создания Fc-слитого белка. Иммуноглобулины у человека могут показывать длительный период полужизни, порядка нескольких недель, из-за большого размера и рециклинга с помощью рецептора FcRn (Kuo et al., J Clin Immunol 30:777-789, 2010 г.). Молекулы рецепторов ФНО 2, LFA-3, CTLA-4, IL-1R и TPO-миметического пептида все являются разрешенными к применению терапевтическими средствами, формируемыми в виде Fc-слияний (Kontermann, Curr Opin Biotechnol 22:868-76, 2011 г.). Fc-слитые белки не идеальны для всех классов терапевтических веществ по нескольким причинам. Гомодимерный характер Fc-участка приводит к формированию димерного терапевтического белка, возможно вызывая клеточную активацию через образование рецепторных кластеров. Fc-слитые белки необходимо также получать в экспрессирующих системах млекопитающих, что может оказаться дороже прокариотных систем.

Кроме Fc, длительный период полужизни *in vivo* благодаря FcRn-рециклину также показывает альбумин. Имея концентрацию приблизительно 40 г/л, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) является наиболее распространенным белком крови. FcRn-рециклинг ведет к длительному периоду полужизни - приблизительно 19 дней у человека. Кроме того, исследования биораспределения указывают на то, что альбумин может распределяться в теле на участки, которые важны для воздействия на заболевание, например воспаленные суставы или опухоли (Wunder et al., J Immunol 170:4793-4801, 2003 г.). Таким образом, период полужизни в сыворотке для ряда белков увеличили путем их формирования в виде или C-концевого, или N-концевого слияния с ЧСА. Успешные слияния включают интерферон альфа (Flisiak and Flisiak, Expert Opin Biol Ther 10:1509-1515, 2010 г.), гормон роста человека (Osborn et al., Eur J Pharmacol 456:149-158, 2002 г.), фактор некроза опухоли (Muller et al., Biochem Biophys Res Commun 396:793-799, 2010 г.), фактор свертывания крови IX (Metzner et al., Thromb Haemost 102:634-644, 2009 г.), фактор свертывания крови VIIa (Schulte, Thromb Res 122 Suppl 4:S14-19, 2008 г.), инсулин (Duttaroy et al., Diabetes 54:251-258, 2005 г.), урокиназу (Breton et al., Eur J Biochem 231:563-569, 1995 г.), гирудин (Sheffield et al., Blood Coagul Fibrinolysis 12:433-443, 2001 г.) и фрагменты биспецифических антител (Muller et al., J Biol Chem 282:12650-12660, 2007 г.). Слитые белки ЧСА могут иметь длительный период полужизни в сыворотке, однако крупномасштабное производство этих слитых белков ограничено преимущественно дрожжевыми экспрессирующими системами. Кроме того, большой размер ЧСА может приводить к потере терапевтической активности вследствие стерических затруднений.

Терапевтические белки также можно формировать как слитые белки с пептидами или белки, которые связываются с сывороточным альбумином в потоке крови, что увеличивает период их полужизни. Такие альбумин-связывающие пептиды включают ограниченные цистеином пептиды или фрагменты антител к альбумину. Экспрессия Fab-фрагмента антитела в качестве слияния с ограниченными цистеином пептидами значительно увеличивает период полужизни Fab в сыворотке (Dennis et al., J Biol Chem 277:35035-35043, 2002 г.; US 2004/0253247 A1). Соединение ограниченного цистеином пептида с фраг-

ментом антитела приводило к улучшению пиковой аккумуляции в опухоли и более однородному распределению по опухоли по сравнению с ситуацией, когда тот же самый антиген является мишенью для молекул Fab и mAb (Dennis et al., *Cancer Res* 67:254-261, 2007 г.; US 2005/0287153 A1). Дополнительно, для увеличения периода полужизни терапевтического средства с терапевтическими фрагментами соединили ряд фрагментов антител, которые специфически связываются с альбумином. Фрагмент антитела V_{HH} семейства верблюдовых (наноантитела Nanobodies®), который связывается с ЧСА, соединили с другим наноантителом Nanobody®, которое связывается с ФНО-альфа (Coppieters et al., *Arthritis Rheum* 54:1856-1866, 2006 г.) или анти-EGFR-наноантителами Nanobodies® (Tijink et al., *Mol Cancer Ther* 7:2288-2297, 2008 г.). Получены антитела к антиальбуминовым доменам (dAbs), которые связываются с альбумином и слиты, например, с рецептором интерлейкина-1 (Holt et al., *Protein Eng Des Sel* 21:283-288, 2008 г.) и интерфероном альфа-2b (Walker et al., *Protein Eng Des Sel* 23:271-278, 2010 г.), увеличивая период полужизни последних.

Известен ряд встречающихся в природе белковых доменов из бактерий, которые взаимодействуют с альбумином, предположительно помогая таким бактериям распределяться по организму-хозяину. Ими являются домены 3-спирального пучкового белка размером приблизительно 6 кДа, которые используют одну поверхность 3-спирального пучка для взаимодействия с сывороточным альбумином (Cramer et al., *FEBS Lett* 581:3178-3182, 2007 г.; Lejon et al., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008 г., 64:64-69; Johansson et al., *FEBS Lett*, 1995 г., 374:257-261; Johansson et al., *J Mol Biol*, 1997 г., 266:859-865; Johansson et al., *J Biol Chem*, 2002 г., 277:8114-8120). Один из таких альбумин-связывающих доменов, полученный из стрептококкового белка G (Jonsson et al., *Protein Eng Des Sel* 21:515-527, 2008 г.), наиболее часто применяют для увеличения периода полужизни белков в сыворотке. Показано, что слияние с этим доменом увеличивает период полужизни растворимого комплементарного рецептора типа 1 (Markrides et al., *J Pharmacol Exp Ther* 277:534-542, 1996 г.), биспецифического антитела (Stork et al., *Protein Eng Des Sel* 20:569-576, 2007 г.), CD4 (Nygren et al., *Vaccines* 91:363-368, 1991 г.; US 6267964 B1), Pfl55/RESA (Stahl et al., *J Immunol Methods* 124:43-52, 1989 г.), Г-КСФ (Frejd, F. PEGS Europe, 5 октября 2010 г.) и молекул типа affibody, связывающихся с рядом мишеней (Andersen et al., *J Biol Chem* 286:5234-5241, 2011 г.) (Frejd, F. PEGS Europe, 5 октября 2010 г.). Однако у пациентов наблюдали формирование антител к данному домену, таким образом, применение этой молекулы в терапевтических целях может представлять сложность (Goetsch et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 10:125-132, 2003 г.; Libon et al., *Vaccine* 17:406-414, 1999 г.).

Ряд белковых доменов или пептидов, которые связываются с альбумином, способны увеличивать период полужизни в сыворотке и давать более эффективное биораспределение терапевтических белков. Для применения этих альбумин-связывающих доменов в терапевтических целях необходимо выполнить ряд биофизических требований, таких как высокий уровень экспрессии в организме-носителе, растворимость и стабильность и минимальная иммуногенность. Альбумин-связывающий фрагмент должен связываться с сывороточным альбумином с аффинностью, которая обеспечивает эффективный баланс между периодом полужизни в сыворотке и биораспределением с активностью терапевтического фрагмента в связанном с альбумином и не связанном с альбумином состоянии.

Изложение сущности изобретения

Один аспект настоящего изобретения представляет собой выделенный искусственный альбумин-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21-34.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения выделенный искусственный альбумин-связывающий домен содержит расширение из 6 аминокислот на своем N-конце.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой слитый белок, содержащий альбумин-связывающий белок согласно настоящему изобретению и биоактивный агент.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен анализ очищенного ABDCon с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Представлены следующие дорожки образцов: 1) маркер молекулярной массы SeeBlue Plus 2, 2) общий клеточный лизат, 3) растворимый клеточный лизат, 4) протекание через колонку, 5-12) элюированные частицы. Слева представлена молекулярная масса для некоторых маркерных полосок.

На фиг. 2 представлен результат масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией очищенного образца ABDCon.

На фиг. 3 представлены результаты эксклюзионной хроматографии очищенного ABDCon, проведенной в ФСБ (фосфатно-солевом буфере).

На фиг. 4 представлена температура плавления А) и обратимость разворачивания ABDCon В), измеренные методом дифференциальной сканирующей калориметрии в ФСБ. В части А представлены нормированные данные с компенсацией базовой линии для первого сканирования. После первого сканирования образец охлаждали до 20°C и повторяли сканирование, чтобы определить обратимость сворачивания. Кривые необработанных данных первого и второго сканирований наложены друг на друга в части В.

На фиг. 5 представлена фармакокинетика слитого белка Tencon25-ABDCon у мышей при дозировке 2 мг/кг внутривенно.

На фиг. 6 представлена фармакокинетика молекулы Tencon25 (остатки 1-90 в последовательности SEQ ID NO: 39), слитой с ABDCon (SEQ ID NO: 21), ABDCon3 (SEQ ID NO: 26), ABDcon5 (SEQ ID NO: 28), ABDCon7 (SEQ ID NO: 30) и ABDCon9 (SEQ ID NO: 32), у мышей при дозировке 2 мг/кг внутривенно.

На фиг. 7 представлена стабильность: А) некоторых слитых белков ABDCon (SEQ ID NO: 1) и домена FN3 и В) слитых белков ABDCon12 (SEQ ID NO: 46) и домена FN3, имеющих расширенную N-концевую спираль на ABDCon, при инкубации при 37°C в течение от 0 до 28 дней в ФСБ.

Подробное описание изобретения

Используемый в рамках изобретения термин "альбумин-связывающий домен" или "домен" относится к полипептиду, который связывает альбумин *in vivo* или *in vitro*. Альбумин может быть получен от любого вида животного, например человека, обезьяны или грызуна.

Используемый в рамках изобретения термин " K_D " относится к константе диссоциации между альбумином и альбумин-связывающим доменом.

Используемый в рамках изобретения термин " K_{on} " относится к константе скорости ассоциации альбумин-связывающего домена с альбумином с образованием комплекса альбумин-связывающий домен/альбумин.

Используемый в рамках изобретения термин " K_{off} " относится к константе скорости диссоциации альбумин-связывающего домена из комплекса альбумин-связывающий домен/альбумин.

Используемый в рамках изобретения термин "искусственный" относится к синтетическому домену, т.е. имеющему аминокислотную последовательность, отсутствующую в природных полипептидах.

Используемый в рамках изобретения термин "замена" или "замены" относится к изменению, делеции или вставке или к изменениям, делециям или вставкам одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательности полипептида или полинуклеотида для получения варианта этой последовательности.

Используемый в рамках изобретения термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от исходного полипептида или исходного полинуклеотида одной или более модификациями, например заменами, вставками или делециями.

Используемый в рамках изобретения термин "биоактивный агент" относится к белкам, антителам, пептидам, нуклеотидам, низкомолекулярным фармацевтическим препаратам и т.п., которые при введении пациенту-животному оказывают благоприятное воздействие на этого пациента. В этот термин включаются синтетически формируемые, выделенные из природных материалов или рекомбинантно формируемые соединения. Биоактивными агентами могут быть аналоги, производные, агонисты, антагонисты, энантиомеры или фармацевтически приемлемые соли биоактивных агентов.

Используемый в рамках изобретения термин "стабильность" относится к способности молекулы сохранять свернутое состояние в физиологических условиях так, что она сохраняет по меньшей мере одну из своих нормальных функциональных возможностей, например период полужизни.

Термин "вектор" обозначает полинуклеотид, способный к воспроизведению в биологической системе или который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, обеспечивающие воспроизведение или сохранение таких полинуклеотидов в биологической системе. Примерами упомянутых биологических систем могут служить клетки, бактерии, вирусы, животные, растения и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к воспроизведению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК либо их гибрид.

Понятие "вектор экспрессии" обозначает вектор, который может использоваться в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, имеющейся в векторе экспрессии.

Используемый в рамках изобретения термин "функционально связанный" относится к такому взаимному размещению компонентов, при котором они функционируют запланированным образом.

В рамках изобретения аминокислоты обозначаются их стандартными трех- или однобуквенными кодами.

Композиции альбумин-связывающих доменов.

Настоящее изобретение относится к синтетическому альбумин-связывающему домену (ABDCon) (SEQ ID NO: 21) и его вариантам. ABDCon может быть функционально связан с биоактивным агентом для увеличения периода полужизни в сыворотке и улучшения биораспределения терапевтического средства. ABDCon и его варианты могут экспрессироваться на высоких уровнях в *E. coli*, растворимы и имеют высокую термостойкость. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие ABDCon и их варианты, комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, а также способы их получения и применения.

Настоящее изобретение дополнительно относится к синтетическому альбумин-связывающему до-

мену (ABDCon), который имеет расширение из 6 аминокислот на N-конце. Это расширение улучшает стабильность ABDCon.

Связывающий домен ABDCon выполнили путем расчета консенсусной аминокислотной последовательности ряда последовательностей 3-спиральных пучковых альбумин-связывающих доменов (ABD), депонированных в неизбыточной базе данных белков, с применением ABD белка G из штамма стрептококка G148 (SEQ ID NO: 1) в качестве шаблона и выбором наиболее широко распространенной аминокислоты в каждой позиции в последовательности (табл. 6). ABDCon имеет высокую аффинность к человеческому альбумину с K_D 75 пМ и K_{off} $3,02 \times 10^{-5}$ 1/с при тестировании в указанных в рамках изобретения условиях, поэтому биоактивные агенты, функционально связанные с ABDCon, могут в значительной степени связываться с альбумином сразу после введения пациенту-животному. У пациента-человека молекулы, которые слишком слабо связываются с сывороточным альбумином, будут иметь короткий период полужизни в сыворотке из-за почечной фильтрации (Hopp et al., Protein Eng Des Sel 23:827-834, 2010 г.), тогда как молекулы, которые слишком прочно связываются с сывороточным альбумином, не будут освобождаться от альбумина в предпочтительном месте действия и, таким образом, в некоторых случаях могут иметь сниженную способность модулировать активность желаемой мишени и обеспечивать терапевтический эффект. Поэтому один из аспектов настоящего изобретения состоит в том, чтобы иметь и быть способным создавать варианты и связывающие домены ABDCon, имеющие целый спектр аффинности к альбумину, и, таким образом, обеспечивать способность модулировать период полужизни биоактивного агента, который функционально связан с вариантами и связывающими доменами ABDCon.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный искусственный альбумин-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (ABDCon): LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA.

Варианты ABDCon можно выполнить путем изучения кристаллической структуры типичного 3-спирального пучкового альбумин-связывающего белка в комплексе с альбумином и предположения, что ABDCon может связывать альбумин так же, как это делает типичный белок. Типичной кристаллической структурой, которую можно использовать, является структура GA-модуля (альбумин-связывающий модуль, относящийся к белку G) белка PAB анаэробной бактерии *Fingoldia magna* (ранее называемой *Peritostreptococcus magnus*) в комплексе с человеческим альбумином (код 1TF0 в банке данных Protein Data Base (PDB) (Leion et al., J Biol Chem 279:42924-42928, 2004 г.)).

Варианты ABDCon, имеющие пониженную аффинность к альбумину, можно выполнить с помощью различных стратегий, например путем нарушения прогнозируемых гидрофобных контактов, нарушения прогнозируемого пи-стэкинга между ароматическими остатками, введения стерических затруднений путем замены более крупными аминокислотами, нарушения солевых мостиков путем удаления заряженных остатков и нарушения водородных связей, прогнозируемых между ABDCon и альбумином. Внесенные изменения выполняют с возможностью уменьшить аффинность связывания, не изменяя поверхность связывания до такой степени, что связывание может не состояться. Например, остаток Y21 можно заменить заряженными аминокислотами (Lys, Arg, Asp, Glu) или малыми аминокислотами (Ala, Gly), чтобы уменьшить гидрофобные взаимодействия между этим остатком и остатками альбумина V325 и F326. Кроме того, остаток Y21 из ABDCon образует водородную связь с остовым альбуминовым остатком N318 и D324, так что незначительные изменения, например мутация на Phe, могут слегка ослабить эти взаимодействия. Предполагается, что остаток Y22 из ABDCon образует гидрофобное, а также пи-стэкинг-взаимодействие с альбуминовыми остатками F309 и F326. Поэтому замена Y22 малыми нейтральными аминокислотами Ala, Ser, Val или заряженными аминокислотами Lys, Arg, Asp или Glu может ослабить гидрофобные контакты и уменьшить аффинность варианта ABDCon к альбумину. Предполагается, что остаток K30 в ABDCon образует солевой мостик с альбуминовым остатком E227, и, таким образом, K30 можно заменять на Asp или Glu, чтобы ввести отталкивающие заряды и потенциально уменьшить аффинность ABDCon к альбумину. Мутация на любую незаряженную аминокислоту также может уменьшить аффинность путем удаления солевого мостика. Предполагается, что остаток ABDCon T31 образует межмолекулярную водородную связь с альбуминовым остатком N267, а замену на Ala или Gly можно применять для нарушения этой межмолекулярной водородной связи без создания крупного стерического затруднения, которое может значительно дестабилизировать это взаимодействие. Остаток ABDCon A37 можно заменять на Val, Thr или другую крупную аминокислоту для создания стерических затруднений. Для удаления заряда остаток E41 можно заменять на Gln или Asp. Можно ожидать, что введение положительно заряженных остатков, например Lys или Arg, дополнительно уменьшит аффинность связывания. Предполагается, что остатки ABDCon L25, E33, G34, L38, I42 и A45 образуют прямой контакт с альбумином, и замены этих остатков, вероятно, будут модулировать аффинность ABDCon к альбумину. Позиции остатков относятся к ABDCon последовательности SEQ ID NO: 21 и человеческому альбумину последовательности SEQ ID NO: 36.

Альтернативно можно использовать случайную смесь аминокислот, используя, например, кодоны NNK для замены в выявленных позициях, а полученные варианты измеряют на связывание с альбумином, используя стандартные способы и способы, описанные в настоящем описании.

Примерами вариантов ABDCon являются варианты, имеющие замены по меньшей мере в одном ос-

татке, выбранном из Y21, Y22, L25, K30, T31, E33, G34, A37, L38, E41, I42 и A45 в последовательности SEQ ID NO: 21.

Примерами вариантов ABDCon являются варианты, имеющие замены по меньшей мере в одном остатке, выбранном из Y21, Y22, K30, T31, A37 и E41 в последовательности SEQ ID NO: 21.

Пример варианта ABDCon содержит аминокислотную последовательность LKEAKEKAI-EELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 22; где X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ и X₆ может представлять собой любую аминокислоту).

В других вариантах осуществления пример варианта ABDCon содержит аминокислотную последовательность LKEAKEKAI-EELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 23), в которой:

- i) X₁ представляет собой лизин (K), аргинин (R), аспартат (D), глутамат (E), аланин (A), глицин (G), фенилаланин (F) или тирозин (Y);
- ii) X₂ представляет собой аланин (A), серин (S), валин (V), лизин (K), аргинин (R), аспартат (D), глутамат (E) или тирозин (Y);
- iii) X₃ представляет собой аспартат (D), глутамат (E) или лизин (K);
- iv) X₄ представляет собой аланин (A), глицин (G) или треонин (T);
- v) X₅ представляет собой валин (V), тирозин (Y) или аланин (A); и
- vi) X₆ представляет собой глутамин (Q), аспарагин (N), лизин (K), аргинин (R) или глутамат (E).

В других вариантах осуществления пример варианта ABDCon содержит аминокислотную последовательность LKEAKEKAI-EELKKAGITSDX₁X₂FDLINKAX₃X₄VEGVNX₅LKDX₆ILKA (SEQ ID NO: 24), в которой:

- i) X₁ представляет собой лизин (K), аланин (A) или тирозин (Y);
- ii) X₂ представляет собой аланин (A), серин (S), валин (V) или тирозин (Y);
- iii) X₃ представляет собой аспартат (D) или лизин (K);
- iv) X₄ представляет собой аланин (A) или треонин (T);
- v) X₅ представляет собой валин (V), тирозин (Y) или аланин (A); и
- vi) X₆ представляет собой глутамин (Q) или глутамат (E).

Дополнительные примеры вариантов ABDCon содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 25-34. Варианты ABDCon тестируют на связывание с альбумином, применяя хорошо известные способы, например анализ *in vitro* с применением плазмонного резонанса (BIAcore, GE-Healthcare, г. Упсала, Швеция). Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре вариант ABDCon/альбумин может меняться в зависимости от разных условий измерения (например, осмолярности, pH). Следовательно, измерения аффинности и других параметров связывания (K_D, K_{оп}, K_{офф} и т.д.) предпочтительно производить с использованием стандартизированных растворов варианта ABDCon и альбумина и стандартизированного буфера, например, описанного в рамках изобретения. Аффинность вариантов ABDCon к альбумину может находиться в диапазоне по меньшей мере от приблизительно 1×10⁻⁵ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻⁶ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻⁷ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻⁸ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻⁹ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻¹⁰ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻¹¹ М, по меньшей мере приблизительно 1×10⁻¹² М или по меньшей мере приблизительно 1×10⁻¹³ М. Например, различные замены Y22 в ABDCon (SEQ ID NO: 21) уменьшали аффинность этих вариантов к альбумину приблизительно в 300-1000 раз в зависимости от замены (табл. 4). Специалисты в данной области могут выполнить и создать дополнительные варианты, имеющие замены в определенных позициях или комбинациях позиций, и, применяя стандартные способы, испытать их на желаемую аффинность связывания с альбумином.

ABDCon и его варианты можно дополнительно модифицировать присоединением расширения из 5 аминокислот к N-концу ABDCon или варианта ABDCon. Расширение из 5 аминокислот может состоять из аминокислотной последовательности TIDEWL (SEQ ID NO: 43) или любой аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42 или 45-55. Включение расширения из 5 аминокислот на N-конце в ABDCon или его вариантах может повысить стабильность молекулы. Расширения из 5 аминокислот на N-конце можно структурно упорядочить как часть первой альфа-спирали ABDCon и его вариантов. Таким образом, улучшенная стабильность молекул, расширенных на N-конце, может быть следствием стабилизации общей структуры спирали. N-концевые варианты ABDCon можно получить, применяя стандартные способы, а их стабильность, например термостойкость, можно оценить способом, описанным в рамках изобретения. Любой альбумин-связывающий домен (ABD) можно модифицировать присоединением 5 N-концевых аминокислот для стабилизации структуры ABD и улучшения стабильности, например термостойкости, полученной молекулы.

ABDCon и его варианты можно дополнительно модифицировать по остаткам, не влияющим на связывание с альбумином, например, с целью улучшить стабильность, уменьшить иммуногенность, улучшить растворимость или любые другие соответствующие характеристики. В одном способе достижения данной цели ABDCon и его варианты можно необязательно получить с помощью процесса анализа родительских последовательностей и различных концептуальных сконструированных продуктов с примене-

нием трехмерных моделей родительских и сконструированных последовательностей. Трехмерные модели широкодоступны и известны специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, иллюстрирующие и показывающие вероятные трехмерные конформационные структуры отобранных последовательностей-кандидатов и способные измерять потенциальную иммуногенность (например, программа Immunofilter компании Xencor, Inc., г. Монровия, штат Калифорния). Изучение этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании потенциальной последовательности, например остатков, влияющих на стабильность домена ABDCon. Таким образом, возможны выбор и комбинирование остатков из родительской и контрольной последовательностей так, чтобы достичь желаемых характеристик, таких как улучшенная стабильность. Альтернативно или в дополнение к вышеописанным процедурам можно применять другие соответствующие способы конструирования, известные специалистам в данной области.

Желаемые физические свойства альбумин-связывающих доменов настоящего изобретения включают высокую термостабильность и обратимость термического сворачивания и разворачивания. Для повышения эффективной термостабильности белков и ферментов использовали несколько способов, включая рациональное выполнение на основании сравнения с термостабильными последовательностями с высокой степенью сходства, выполнение стабилизирующих дисульфидных мостиков, мутации для повышения склонности к образованию альфа-спирали, конструирование солевых мостиков, изменение поверхностного заряда белка, направленную эволюцию, а также состав консенсусных последовательностей (Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol 12:371-375, 2001 г.). Высокая термостабильность может повышать выход экспрессируемого белка, повышать растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии для производства.

Остатки, которые можно заменить для улучшения любых характеристик альбумин-связывающих доменов настоящего изобретения, можно определить путем выполнения замены и анализа желаемых характеристик альбумин-связывающего домена. Например, для определения в ABDCon и его вариантах тех позиций, которые могут влиять на стабильность альбумин-связывающего домена, можно применять сканирование аланином.

В отношении потери стабильности, т.е. "денатурирование" или "денатурация" белка означают процесс, в котором происходит потеря части или всей трехмерной конформации, приводящая к потере функциональных свойств белка с соответствующей потерей активности и/или растворимости. Разрушаемые при денатурации силы включают внутримолекулярные связи, например электростатические, гидрофобные, ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи и дисульфиды. Денатурацию белка можно вызвать путем приложения к белку или содержащему белок раствору сил, таких как механическое воздействие (например, компрессионное или сдвиговое усилие), тепловой, осмотический стресс, изменение pH, электрические или магнитные поля, ионизирующее излучение, ультрафиолетовое излучение и дегидратация, а также путем воздействия химических денатурирующих веществ.

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один и тот же или как различные аспекты целостности белка. Белки чувствительны или "лабильны" к денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим облучением, изменением осмолярности и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым облучением, ионизирующим облучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или силой, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить стандартными способами. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления (T_m) - температуры в градусах Цельсия ($^{\circ}\text{C}$), при которой половина молекул разворачивается, применяя стандартные способы. Как правило, чем выше T_m , тем более стабильной является молекула. Помимо нагрева, способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также можно изменять в зависимости от химического окружения.

Химическую денатурацию можно также измерить различными способами. Химические денатурирующие вещества включают гидрохлорид гуанидиния, тиоцианат гуанидиния, мочевины, ацетон, органические растворители (ДМФА, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитротиибензол, а также гидриды, такие как боргидрид натрия), неионные и ионные моющие средства, кислоты (например, соляная кислота (HCl), уксусная кислота (CH_3COOH), галогензамещенные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды), а также направленные денатурирующие агенты. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам либо разрушение или образование дисульфидных связей.

Связывающий домен ABDCon и его варианты могут быть функционально связаны с биоактивным агентом. Примерами биоактивных агентов являются пептиды и белки, которые могут быть функционально связаны с ABDCon и его вариантами с помощью хорошо известных линкеров, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин (линкер Gly-Ser) или аланин и пролин. Применение природ-

ных, а также искусственных пептидных линкеров хорошо известно в отраслевой литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264:5260-5268, 1989 г.; Alfthan et al., Protein Eng. 8:725-731, 1995 г.; Robinson & Sauer, Biochemistry 35:109-116, 1996 г.; патент США № 5856456). Биоактивный агент может быть связан с ABDCon или его вариантами по своему С- или N-концу. С ABDCon также можно связать полиспецифические биоактивные агенты. В таких случаях ABDCon может быть связан с N-концом или С-концом молекулы. ABDCon также можно разместить внутри такого полиспецифического агента, связав его с С-концом одного агента и N-концом другого. Биоактивные агенты также можно соединять с альбумин-связывающими доменами настоящего изобретения с применением химического перекрестного сшивания, хорошо известного в отрасли, например с применением гидразонового или семикарбазонового мостика. Примерами биоактивных агентов являются белки, специфически связывающие антигены-мишени, например белки, идентифицированные из библиотек белков с повторами фибронектина III типа (FN3), например библиотек на основе Tencon25, описанных в патентах WO 2011/137319 A2 и WO 2010/093627 A2.

В ABDCon или его варианты, составляющие предмет настоящего изобретения, можно встроить дополнительные фрагменты, такие как конъюгаты токсинов, молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандионовую кислоту, тетрадекандионовую кислоту, октадекандионовую кислоту, докозандионовую кислоту и т.п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими ABDCon последовательностями, и их можно создавать стандартными методиками клонирования и экспрессии. Альтернативно для прикрепления фрагментов в формируемые рекомбинантным способом ABDCon настоящего изобретения можно применять хорошо известные способы химического связывания.

ABDCon и его варианты, а также слитые белки биоактивных агентов и ABDCon можно оценивать по периоду их полужизни, применяя хорошо известные фармакокинетические свойства в моделях *in vivo*. Примеры ABDCon и его вариантов связывают альбумин с K_D приблизительно в диапазоне 1 пМ-1 мкМ, в диапазоне 75 пМ-860 нМ, в диапазоне 100 пМ-500 нМ или в диапазоне 1-100 нМ.

Создание и формирование ABDCon и его вариантов.

Создание альбумин-связывающих доменов согласно настоящему изобретению обычно осуществляют на уровне нуклеиновой кислоты с использованием стандартных способов. Варианты ABDCon, имеющие замененные кодоны по одному или более конкретным остаткам, можно синтезировать, например, с применением стандартных способов клонирования с помощью ПЦР или химического синтеза генов в соответствии со способами, описанными в патентах США № 6521427 и № 6670127, или посредством мутагенеза по Кункелю (Kunkel et al., Methods Enzymol 154:367-382, 1987 г.). Если для каких-либо позиций остатков планируют применять рандомизированные кодоны, рандомизацию можно провести с применением хорошо известных способов, например вырожденных олигонуклеотидов, соответствующих заданному разнообразию, или, например, с применением кодонов NNK, которые кодируют все 20 природных аминокислот. В других схемах диверсификации можно применять кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно можно применять кодоны NNS для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Специалистам в данной области хорошо известен синтез олигонуклеотидов с выбранной "вырожденностью" нуклеотидов в определенных позициях, например, подход TRIM (Knappek et al., J Mol Biol 296:57-86, 1999 г.; Garrard & Henner, Gene 128:103-109, 1993 г.). Такие наборы нуклеотидов, имеющие определенные наборы кодонов, можно синтезировать с применением доступных в продаже нуклеотидных или нуклеозидных реагентов и устройств.

Для клонирования ABDCon или его вариантов в вектор или синтеза двухцепочечной кДНК ABDCon для экспрессии или трансляции белка *in vitro* применяют стандартные методики клонирования и экспрессии. Биоактивные агенты можно функционально связать с ABDCon или его вариантами с применением хорошо известных способов.

Хотя настоящее изобретение выше было описано в общих чертах, варианты осуществления настоящего изобретения будут дополнительно описаны в следующих примерах, которые никоим образом не ограничивают действия пунктов формулы изобретения.

Пример 1. Создание искусственного альбумин-связывающего домена.

Выполнение консенсусной последовательности для искусственного альбумин-связывающего домена (ABDCon).

Искусственный альбумин-связывающий домен (ABD) выполнили путем расчета консенсусной аминокислотной последовательности из 3-спиральных пучковых последовательностей ABD, депонированных в избыточной базе данных белков. Для определения консенсусной последовательности использовали ABD из белка G из штамма стрептококка G148 (SEQ ID NO:1) в качестве шаблонной последовательности для поиска с помощью программы BLAST в избыточной базе данных белков NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для BLAST-поиска использовали все настройки по умолчанию.

нию; порог ожидания (Expect threshold)=10, длина слова (word size)=3, матрица (matrix)=BLOSUM62, цены делеции (gap costs)=наличие 11, продление 1 и композиционные поправки (compositional adjustments)=условная композиционная поправка матрицы. Из этого поиска выбрали 20 наиболее близкородственных белковых доменов, приведенных в табл. 1 (SEQ ID NO: 1-20), чтобы включить их в множественное выравнивание последовательностей для определения консенсусной последовательности. Выбрали только избыточные последовательности. Несколько номеров доступа белков приведены в табл. 1 множество раз, что указывает на то, что некоторые белки содержат несколько близкородственных доменов ABD. Последовательность SEQ ID NO: 4 представляет собой искусственный ABD, полученный путем фогового отображения и перетасовки генов (He et al., Protein Sci 16:1490-1494, 2007 г.).

Таблица 1

Номер доступа белкового домена	SEQ ID NO:
P19909	1
AAA26847	2
AAA26847	3
2FS1_A	4
YP_002123072	5
ZP_07321229	6
ZP_07321229	7
AAA67503	8
AAA67503	9
AAA67503	10
AAA67503	11
ZP_07734934	12
ZP_06946534	13
ZP_07321240	14
ZP_07906833	15
Q51911	16
YP_001692809	17
ZP_07702676	18
ZP_07702676	19
ZP_07268895	20

Множественное выравнивание последовательностей из перечисленных последовательностей получили с применением программного обеспечения AlignX (со всеми настройками по умолчанию). Выравнивание последовательности, показанное в табл. 6, применили для выбора наиболее широко распространенной аминокислоты в каждой позиции в последовательности, чтобы получить консенсусную последовательность альбумин-связывающего домена, ABDCon (SEQ ID NO: 21, табл. 6). Для позиции 21 выбрали Туг вместо Ile, так как для этой позиции явного консенсуса не было, а ароматические остатки Туг и Phe были хорошо представлены. Степени попарной идентичности последовательностей с ABDCon находятся в диапазоне от 45% (SEQ ID NO: 3) до 82% (SEQ ID NO: 8, 13, 14 и 16).

Синтез гена.

Аминокислотную последовательность консенсусной последовательности альбумин-связывающего домена (ABDCon) транслировали обратно в нуклеотидную последовательность, кодирующую ABDCon, с применением предпочтительных кодонов для экспрессии в *E. coli*, как показано ниже (SEQ ID NO: 35), и получили синтетический ген (BlueHeron Biotechnologies). К последовательности синтетического гена SEQ ID NO: 34 присоединили 5' и 3' последовательности ДНК для присоединения сайтов NdeI и XhoI для субклонирования, а также последовательности ДНК, кодирующие N-концевую 8-His метку для очистки белка. Этот ген клонировали в вектор pET26 (Novagen) для экспрессии, стимулируемой промоторной последовательностью T7, и трансформировали в штамм *E. coli* BL21(DE3) (Novagen).

Экспрессия и очистка.

Для экспрессии ABDCon 50 мл среды LB, дополненной 30 мкг/мл канамицина, инокулировали одной колонией и выращивали в течение одной ночи при 37°C и встряхивании при 220 об/мин. На следующий день 10 мл ночной культуры добавили к 100 мл среды Terrific Broth, дополненной 30 мкг/мл канамицина, и выращивали культуру в течение 2,5 ч при 37°C и 220 об/мин. Затем добавили ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и уменьшили температуру до 30°C для индуцирования экспрессии белка. Клетки собрали через 14 ч путем центрифугирования при 4000×g в течение 20 мин, а клеточный осадок хранили при -20°C. Замороженный клеточный осадок повторно суспендировали в 5 мл реагента Bug-Buster HT (Novagen) на грамм влажного осадка и осторожно перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Молекулу ABDCon, меченную полигистидином, очистили с помощью хроматографии на Ni-NTA (GE Healthcare), элюируя в буфере с 50 мМ фосфата натрия при pH 7,4, 500 мМ хлорида натрия с градиентом 10-250 мМ имидазола. Содержащие ABDCon фракции объединили и дополнительно очистили путем эксклюзионной хроматографии с применением колонки Superdex75 16/60 (GE Healthcare) с ФСБ в качестве подвижной фазы. Чистоту оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (фиг. 1). Масс-спектрометрия дала массу 6383 Да, что согласовалось с теоретической массой 6382 Да (фиг. 2). Аналитическая эксклюзионная хроматография с применением колонки Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) показывает, что препарат ABDCon не содержит агрегатов и элюируется во время, согласующееся с мо-

номерным белком (фиг. 3).

Пример 2. Характеризация ABDCon.

Термостабильность ABDCon.

ABDCon концентрировали до 2,175 мг/мл в ФСБ pH 7,4 и оценили термостабильность с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Данные по стабильности получили нагреванием 400 мкл раствора ABDCon от 25 до 100°C при скорости нагрева 1°C в минуту в микрокалориметре VP-DSC (MicroCal). Для оценки обратимости термического сворачивания/разворачивания провели на образце второе идентичное сканирование. Для вычисления температуры плавления полученные данные аппроксимировали в модели разворачивания с 2 состояниями. На фиг. 4 показано, что ABDCon имеет высокую термостабильность 81,5°C в ФСБ и что сворачивание полностью обратимо.

Связывание ABDCon с альбумином.

Кинетику связывания ABDCon с человеческим сывороточным альбумином и мышинным сывороточным альбумином измеряли с помощью системы для анализа белковых взаимодействий ProteOn™ XPR-36 (Bio-Rad) с применением сенсорных чипов GLC. Сывороточный альбумин человека (SEQ ID NO: 36), макака-резуса (SEQ ID NO: 37) и мыши (SEQ ID NO: 38) приобрели у компании Sigma (каталог № A4327 для альбумина человека, № A3559 для альбумина мыши и № A4297 для альбумина макака-резуса) и повторно суспендировали в ФСБ в разных концентрациях. Каждый сывороточный альбумин непосредственно иммобилизовали на канале лигандов в вертикальной ориентации чипа GLC посредством стандартного аминокислотного связывания в концентрации 2,1 мкг/мл при pH 5,0, получив поверхности с плотностью лигандов 500-1000 резонансных единиц. Связывание рекомбинантного ABDCon тестировали одновременным пропусканием пяти разных концентраций (например, 1 мкМ с последовательным 3-кратным разбавлением) в качестве аналитов в горизонтальной ориентации на поверхностях с иммобилизованным сывороточным альбумином. Стадии диссоциации для всех концентраций отслеживали в течение двух часов при скорости потока 100 мкл/мин с применением PBST (ФСБ, 0,005% Tween20) в качестве подвижного буфера. Для отслеживания стабильности базовой линии ввели шестой образец (только буферный раствор). Поверхности восстанавливали применением 1 короткого импульса (18 мкл) 0,8% фосфорной кислоты.

Таблица 2

Альбумин	K_{on} (1/МС)	K_{off} (1/с)	K_D (М)
Человек	4,04E+05	3,02E-05	7,48E-11
Мышь	2,41E+05	7,76E-04	3,22E-09
Макак-резус	1,13E+06	6,78E-05	6,01E-11

Полученные данные ответа сначала обработали вычитанием ответов на образец только с буферным раствором и неспецифического связывания между аналитами и чипом. Обработанные данные для всех пяти концентраций глобально аппроксимировали в простой ленгмюровской модели связывания 1:1 для каждой поверхности с лигандами. Табл. 2 описывает кинетику связывания, определенную для каждого вида альбумина.

Период полужизни слияния ABDCon в сыворотке у мышей.

Способность ABDCon увеличивать период полужизни слитого белка в сыворотке оценивали путем получения синтетического гена, кодирующего слияние ABDCon с С-концом Tencon25. Tencon25 является белковым каркасом, основанным на консенсусной последовательности белка с повторами фибронектина III типа (FN3), который имеет последовательность, приведенную в остатках 1-90 в последовательности SEQ ID NO: 39, и описан в патенте US 2011/0274623 A1. Для белковых доменов Tencon25 и ABDCon слияние осуществили с помощью пептидного линкера (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 40). Полученный слитый белок имеет полипептидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 39. В целях очистки на С-конце включили полигистидиновую метку. 69 мышей женского пола инбредной линии BALB/c разделили на 3 группы (N=3 в группе 1, контроль без введения препаратов, и N=33 в группах 2-3). Мышам вводили одну дозу слитого белка Tencon25-ABDCon внутривенно в расчете 2 мг/кг. Дозировка основывалась на массе животных в день введения. Мышей умерщвляли в следующих временных точках после инъекции: 10 мин, 30 мин, 1, 4, 6 ч и 1, 2, 3, 7, 10, 14 суток. У каждого животного забирали образцы крови посредством пункции сердца. Образцам крови давали свернуться при комнатной температуре в течение 30 мин, но не дольше 1 ч. Затем образцы крови центрифугировали при приблизительно 3500 об/мин в течение 15 мин. Образцы сыворотки анализировали с применением гомогенного ИФА по сэндвич-методу на платформе Mesoscale Discovery. Планшеты Streptavidin-Gold (Mesoscale Discovery) блокировали на 1 ч раствором Superblock (TBS) Tween-20 (Thermo). Поликлональное антитело к Tencon25 использовали как для захвата (биотинилированное), так и для обнаружения (меченное MSD Sulfo-Tag (Mesoscale Discovery)) в концентрации 0,625 мкг/мл. К планшетам добавили антиген и антитела и инкубировали их в течение 2 ч при комнатной температуре и энергичном встряхивании. Планшеты промыли раствором TBS-T (Sigma) и добавили буферный раствор MSD Read Buffer с поверхностно-активным веществом (Mesoscale Discovery). Планшеты прочитали с помощью считывающего устройства MSD Sector Imager 6000. Данные проанализировали с помощью статистического программного пакета GraphPad Prism. Предыдущие исследования показали, что сходная неслитая молекула Tencon быстро выводится из

крови: у мышей период полужизни в сыворотке составил приблизительно 20 мин. Слияние Tencon25 с ABDCon увеличивает период полужизни в сыворотке до свыше 60 ч (фиг. 5).

Пример 3. Конструирование ABDCon с варьирующей аффинностью к сывороточному альбумину.

Аффинность связывания с сывороточным альбумином может обуславливать не только период полужизни терапевтического белка в сыворотке, но и способность этой молекулы связывать и нейтрализовать свою мишень. Например, молекула, которая связывает сывороточный альбумин слишком слабо, будет иметь короткий период полужизни в сыворотке в связи с почечной фильтрацией в несвязанном с альбумином состоянии (Hopp et al., Protein Eng Des Sel 23:827-834, 2010 г.). И наоборот, молекула, которая слишком прочно связывается с альбумином, не будет освобождаться от альбумина в предпочтительном месте действия и, таким образом, в некоторых случаях может быть неспособна нейтрализовать желаемую мишень. Поэтому предпочтительнее достигать продления периода полужизни посредством связывания альбумина таким образом, чтобы прочность взаимодействия с альбумином обеспечивала только желаемый период полужизни в сыворотке. Поскольку описанная в рамках изобретения последовательность ABDCon связывается с человеческим сывороточным альбумином с аффинностью 75 пМ и скоростью диссоциации $3,02 \times 10^{-5}$ 1/с (при описанных в рамках изобретения экспериментальных условиях), молекулы, слитые с ABDCon, в значительной степени свяжутся с альбумином сразу после введения животному или пациенту. Для некоторых мишеней и слияний может быть желательной менее прочная связь с сывороточным альбумином. Для снижения аффинности связывания ABDCon с альбумином выполнили 10 мутантных вариантов ABDCon. Эти мутанты приведены в табл. 3:

Таблица 3

Конструкт	Мутация*	SEQ IN NO:	Обоснование
ABDCon2	Y21A	25	Нарушение ароматического стэкинга с альбуминовыми остатками F309 и F326
ABDCon3	Y21K	26	Нарушение ароматического стэкинга с альбуминовыми остатками F309 и F326. Введение стерического затруднения
ABDCon4	Y22A	27	Ослабление гидрофобных контактов
ABDCon5	Y22S	28	Ослабление гидрофобных контактов
ABDCon6	Y22V	29	Незначительное ослабление гидрофобных контактов
ABDCon7	E41Q	30	Удаление заряда для нарушения солевого мостика
ABDCon8	K30D	31	Изменение заряда для нарушения солевого мостика
ABDCon9	T31A	32	Удаление межмолекулярной водородной связи
ABDCon10	A37V	33	Введение стерического затруднения
ABDCon11	A37Y	34	Введение стерического затруднения

* - нумерация аминокислот согласно SEQ ID NO: 21.

Мутантов ABDCon выбирали путем изучения кристаллической структуры GA-модуля (альбумин-связывающего модуля, относящегося к белку G), связанного с человеческим сывороточным альбумином (код 1TF0 в банке данных Protein Data Base (PDB)) (Lejon et al., Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64:64-69, 2008 г.), при предположении, что ABDCon связывает альбумин так же, как это делает GA. Мутанты были выполнены с возможностью снижения аффинности ABDCon к альбумину путем нарушения гидрофобных контактов, введения стерических затруднений, нарушения солевых мостиков и нарушения водородных связей (табл. 3). Внесенные изменения были выполнены с возможностью уменьшить аффинность связывания, не изменяя поверхность связывания настолько резко, что связывание может не состояться. Каждого мутанта экспрессировали и очистили из *E. coli*, как это было описано для ABDCon. Мутант ABDCon11 оказался нерастворимым, поэтому его исключили из дальнейшего анализа. Аффинность каждого варианта к сывороточному альбумину человека, мыши и макака-резуса определяли поверхностным плазмонным резонансом, полученные результаты представлены в табл. 4. В дополнение к позициям, приведенным в табл. 3, для увеличения или уменьшения аффинности ABDCon к альбумину можно мутировать остатки L25, E33, G34, L38, I42 и A45, так как они предположительно будут входить в непосредственный контакт с альбумином.

Таблица 4

Вариант	K _D человека (нМ)	K _D мыши (нМ)	K _D макака-резуса (нМ)
ABDCon2	6,1	N/O	17,5
ABDCon3	1	103	5,1
ABDCon4	13,6	571	43,7
ABDCon5	54,8	1650	104
ABDCon6	2,7	190	8,4
ABDCon7	0,4	20,6	0,5
ABDCon8	43	1001,7	65
ABDCon9	860	550,8	206
ABDCon10	0,8	37,8	1,3

Пример 4. Период полужизни слитых белков с вариантами ABDCon в сыворотке.

Для Tencon25 (аминокислоты 1-90 в последовательности SEQ ID NO: 39) выполнили слияние с вариантами ABDCon 3, 5, 7 и 9 (табл. 3) для оценки корреляции между аффинностью ABDCon к альбумину и увеличением периода полужизни. Эти молекулы ввели мышам дозами по 2 мг/кг, как было описано выше в предыдущих исследованиях, и проанализировали с применением способов, идентичных тем, которые применялись для слияний Tencon25-ABDCon. Обобщенные фармакокинетические параметры, полученные для этих молекул, приведены в табл. 5 и на фиг. 6. Здесь показано, что скорость выведения снижается по мере возрастания аффинности к альбумину, пока не будет достигнута аффинность 103 нМ, и в этой точке значительные различия в фармакокинетических параметрах отсутствуют. Данные в табл. 5 показывают способность регулировать такие свойства, как период полужизни, скорость выведения и общее воздействие (ППК), путем варьирования аффинности молекулы ABDCon к альбумину.

Таблица 5

Конструкт	K _d (нМ)	T (1/2) (часов)	Объем распределения (мл/кг)	Выведение (мл/ч/кг)	ППК (час*нг/мл)
Tencon25-ABDCon	1,86	60,42	83,2873	0,9555	2054332
Tencon25-ABDCon3	103	45,8355	60,645	0,915	2166461
Tencon25-ABDCon5	1650	32,8715	223,86	4,72	423635
Tencon25-ABDCon7	20,6	46,7499	49,915	0,74	2681641
Tencon25-ABDCon9	550,8	34,1956	81,87	1,66	1205061

Таблица 6

SEQ ID	Последовательность
13	LKEAKEKAVEELKENGITSEKYIDQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
14	LKEAKEKAVEELKNNGITSEKYIDQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
17	LKEAKEKAVEELKNNGITSEKYIEQINKAKTVEGVNALKDEIIKA
20	LKEAKEKAIIEELKNNGITSEKYIEQINKAKTVEGVNALKDEIIS
7	LKDAKEKAIEAIRKEGVKSLYEDLINKAKTIDGVNALRDQITEA
1	LAEAKVLANRELDKYGVS-DYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
2	LSEAKEMAIRELDQGVVS-DYKKNINNAKTVEGVVALKDLILNS
3	LDQAKQALKEFDYGVVS-NYYKNLINKAKTVEGIMELQAVV--
12	LAEAKKVAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLKAYVAETLAA
15	LAEAKKVAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLAA
18	LAEAKNVAAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLAA
19	LAEAKKAAHEEFTKAGITGKIFHDAIDAAKTVEGLQAYVAETLKA
4	LAQAKEAAIKELKQYGIG-DYYIKLINNAKTVEGVESLKNEILKA
5	LLKAKEAAINELKQYGIS-DYYVTLINKAKTVEGVNALKAEILSA
16	LKNAKEDAIKELKAGITSDYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKA
10	LKNAKEDAIKELKEAGITSDYFDINKAKTVEGVNALKNEILKA
11	LKNAKEDAIKELKEAGITSDYFDINKAKTIEGVNALKNEILKA
6	LKNAKEDAIKELKEAGIKSQFFNLINNAKTVEGVESLKNEILKA
9	LKNAKEAAIKELKEAGITAEYLFNLINKAKTVEGVESLKNEILKA
8	LKNAKEAAIKELKEAGITSDYFSLINKAKTVEGVNALKNEILKA
21	LKEAKEKAIIEELKAGITSDYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA

Пример 5. Стабилизация альбумин-связывающих доменов.

Провели исследование для определения стабильности ABDCon (SEQ ID NO: 21) при формировании слитых белков с различными доменами фибронектина III типа (FN3) (см., например, патент № US 2010/0216708). Слитые белки домена FN3 и ABDCon получили, используя стандартные методики клонирования. Аминокислотная последовательность одного из слитых белков Tencon-ABDCon представлена в SEQ ID NO: 41. Другими полученными слитыми белками домена FN3 и ABDCon стали Tencon25-ABDCon, 83-ABDCon и 71-ABDCon. Эти белки сформировали с С-концевыми полигистидиновыми метками и очистили комбинацией аффинной хроматографии на никелевой агарозе и эксклюзионной хроматографии с применением стандартных способов. Каждую очищенную молекулу инкубировали в ФСБ при pH 7,4 при 37°C в течение 28 дней и затем анализировали с использованием ДСН-ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии. Фиг. 7А показывает, что каждый слитый белок домена FN3 и ABDCon распадался во время такой инкубации, о чем свидетельствует появление низкомолекулярных полос на геле для ДСН-ПААГ-электрофореза. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что основной схемой распада было разрезание данных молекул по остаткам L1, K2 и E3 в последовательности

ABDCon (SEQ ID NO: 21). Кроме того, наблюдали, что ABD нативного белка G стрептококка (SEQ ID NO: 1), слитый с доменом FN3, демонстрирует сходную схему разложения с разрезанием по остатку L1 при инкубации при 4°C в течение 6-8 месяцев (данные не представлены). Наконец, наблюдали, что несколько очищенных партий нативного ABD (SEQ ID NO: 1) и ABDCon (SEQ ID NO: 21) потеряли активность и не обнаруживались в растворе ДСН-ПААГ-электрофорезом после хранения в течение нескольких месяцев при 4°C, что свидетельствует о сильном разложении.

Приведенные выше наблюдения указывают, что N-концевая альфа-спираль ABDCon и структуры нативного ABD, применяемые для увеличения периода полужизни в сыворотке, нестабильны. Нехватка стабильности для таких слитых белков нежелательна, поскольку это ограничивает срок хранения таких молекул для исследований, а также для терапевтических целей. По существу, разработали стратегию для улучшения стабильности этих молекул. Анализ трехмерных структур альбумин-связывающих доменов, депонированных в банке данных Protein Data Bank, свидетельствует, что аминокислотная последовательность TIDQWL (SEQ ID NO: 42), обнаруженная на N-конце от начала нативного ABD (SEQ ID NO: 1), структурно упорядочена как часть первой альфа-спирали этой молекулы в нескольких кристаллических структурах (например, PDB 2VDB, Acta Cryst 2008 г., F64, 64-69). Этим она отличается от первоначальной структуры ЯМР ABD, которая показала, что эта область не упорядочена в растворе (PDB 1GAB, Johansson et al., J. Mol. Biol. 266:859-865, 1997 г.). Таким образом, была выдвинута гипотеза, что расширение этой первой альфа-спирали последовательностей ABD и ABDCon может придать такой области большую стабильность, так как расширение альфа-спиралей может придать большую стабильность такой спирали (Su et al., Biochemistry 33:15501-15510, 1994 г.).

Множественное выравнивание последовательностей природных альбумин-связывающих доменов, представленное в табл. 1, не обнаружило четкой консенсусной последовательности для этих N-концевых остатков. Однако на N-конце в 5 из этих белковых доменов присутствует одна пептидная последовательность TIDEWL (SEQ ID NO: 43). Таким образом, присоединением последовательности TIDEWL к N-концу ABDCon создали новый конструктор ABDCon12 (SEQ ID NO: 44). Этот белок экспрессировали с N-концевой полигистидиновой меткой и очистили до гомогенности, применяя стандартные способы аффинной хроматографии на никелевой агарозе и эксклюзионной хроматографии. Очищенный ABDCon12 инкубировали при 37°C в ФСБ в течение 28 дней, а стабильность оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии. ДСН-ПААГ-электрофорез показал слегка более быструю схему миграции после 14 дня, что указывает на распад. Однако анализ общей массы продемонстрировал, что этот распад происходит исключительно в полигистидиновой метке, а не в последовательности ABDCon12, что указывает на то, что последовательность TIDEWL улучшила стабильность ABDCon. Дополнительным доказательством стабильности выступает стабильность созданного слитого белка домена FN3 и ABDCon12 (фиг. 7B), в котором наблюдают значительно меньше продуктов распада в сравнении с первоначальными молекулами домена FN3 и ABDCon (фиг. 7A) в случае инкубации при 37°C в ФСБ в течение 28 дней.

Для исследования механизма стабилизации для этой молекулы определили температуру плавления ABDCon12 методом дифференциальной сканирующей калориметрии, применяя процедуру, описанную выше в примере 2. В ФСБ получили температуру плавления 90,9°C, на 9,4° выше по сравнению с исходной молекулой ABDCon, что позволяет предположить, что снижение протеолиза/распада, наблюдаемое для слитых белков ABDCon12 и ABDCon12, является результатом повышения конформационной стабильности, которое стало возможным благодаря расширению N-концевой альфа-спирали.

SEQ ID NO: 41: Tencon-ABDCon

MLPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYD LTGLKPG-
TEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTTGGGGSGGGSLKEAKEKAIEELKKAGITSDY YF-
DLINKAKTVEGVNALKDEILKAGGHHHHHH

SEQ ID NO: 42: N-концевая последовательность ABD из стрептококкового белка G

TIDQWL

SEQ ID NO: 43: N-концевая последовательность, присоединенная к ABDCon

TIDEWL

SEQ ID NO: 44: ABDCon12

TIDEWLLKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVEGVNALKDEILKA

Пример 6. Характеризация ABDCon12.

Аффинность очищенного ABDCon12, связывающегося с человеческим и мышинным альбумином, определили методом поверхностного плазмонного резонанса, применяя те же способы, которые были описаны выше в примере 2. Для связывания ABDCon12 с человеческим и мышинным альбумином получили константы диссоциации 0,7 и 8,2 нМ соответственно. Способность ABDCon12 увеличивать период полужизни слитой молекулы в сыворотке продемонстрировали слиянием ABDCon12 с C-концом FNS-домена, который специфически связывает антиген. Эту молекулу ввели мышам интраперитонеальной инъекцией по 2 мг/кг и проанализировали так, как описано выше в примере 4. Для слитого белка из домена FN3 и ABDCon12 измеренный конечный период полужизни составил 55 ч.

Пример 7. Стабилизация альбумин-связывающих доменов.

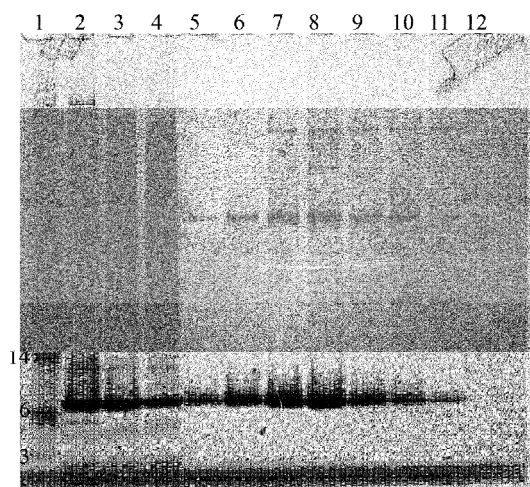
На основании анализа последовательностей природных альбумин-связывающих доменов ожидается, что другие последовательности, присоединяемые к N-концу альбумин-связывающих доменов, могут сделать их более стабильными. Например, для этих природных альбумин-связывающих доменов на N-конце имеются несколько разных последовательностей, таких как, без ограничений, APAVDV (SEQ ID NO: 45), IAKEKA (SEQ ID NO: 46), TIDQWL (SEQ ID NO: 42), VPAADV (SEQ ID NO: 47), TVKSIE (SEQ ID NO: 48), TPAVDA (SEQ ID NO: 49), TLKSIK (SEQ ID NO: 50), WEKAAA (SEQ ID NO: 51), AVDANS (SEQ ID NO: 52), QLAAEA (SEQ ID NO: 53), ALKAAA (SEQ ID NO: 54), EKLAAA (SEQ ID NO: 55). Присоединение этих последовательностей к альбумин-связывающим доменам может увеличить стабильность, если эти последовательности сформируют более длинные альфа-спирали. Кроме того, предполагается, что искусственные пептиды, которые увеличивают длину альфа-спирали или стабильность, будут также стабилизировать альбумин-связывающие домены.

Можно создать варианты с дополнительными N-концевыми последовательностями, применяя стандартные методики, и провести испытания их свойств так, как описано выше.

Ясно, что применение изобретения на практике может отличаться от приведенного в предшествующем описании и примерах. Многочисленные модификации и вариации настоящего изобретения возможны с учетом вышеизложенных идей, а, следовательно, в рамках прилагаемой формулы изобретения.

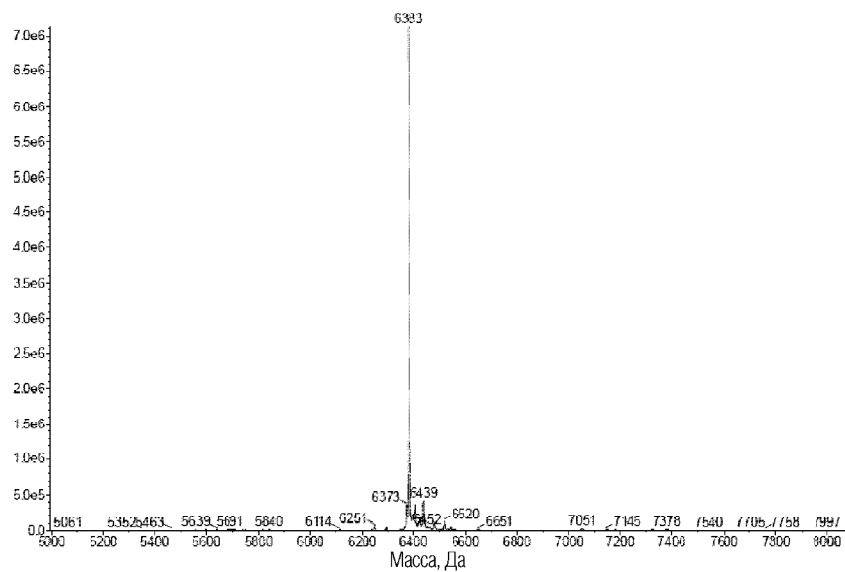
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный искусственный альбумин-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21-34.
2. Выделенный альбумин-связывающий домен по п.1, дополнительно содержащий расширение из 6 аминокислот на своем N-конце.
3. Выделенный альбумин-связывающий домен по п.2, в котором расширение из 6 аминокислот содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 42, 43, 45-55.
4. Выделенный альбумин-связывающий домен по п.2, в котором расширение из 6 аминокислот содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.
5. Выделенный альбумин-связывающий домен по п.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.
6. Слитый белок для доставки биоактивного агента, содержащий альбумин-связывающий домен по п.1 и указанный биоактивный агент.
7. Слитый белок по п.6, в котором биоактивным агентом является белковый каркас, специфически связывающийся с молекулой-мишенью.
8. Слитый белок по п.7, в котором белковый каркас включает аминокислотные остатки 1-90 последовательности SEQ ID NO: 39.
9. Слитый белок по п.6, в котором альбумин-связывающий белок и биоактивный агент функционально связаны линкером.
10. Слитый белок по п.9, в котором линкер представляет собой линкер Gly-Ser.
11. Слитый белок по п.9, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

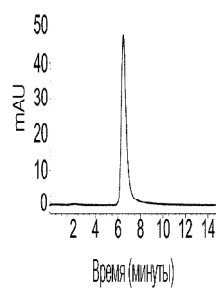


Фиг. 1

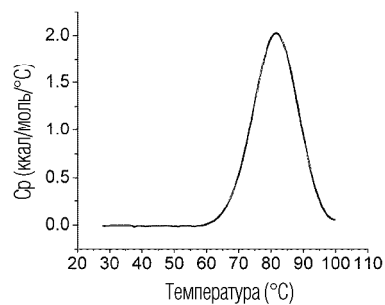
036487



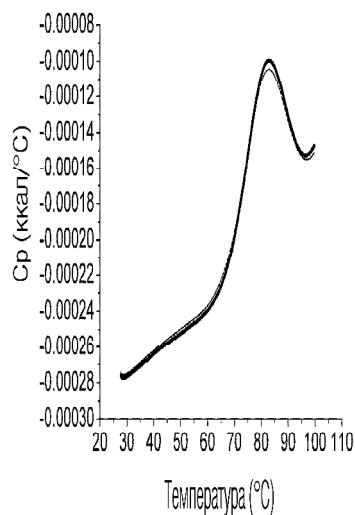
Фиг. 2



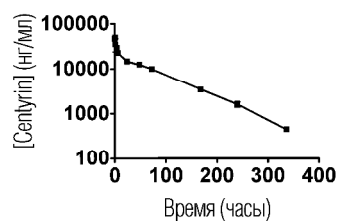
Фиг. 3



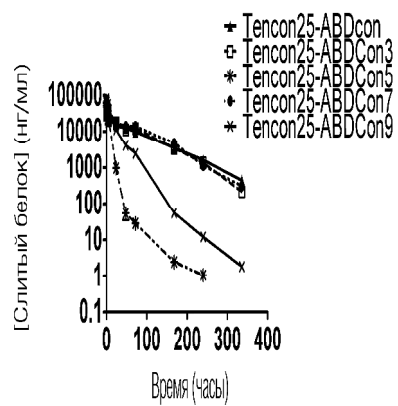
Фиг. 4А



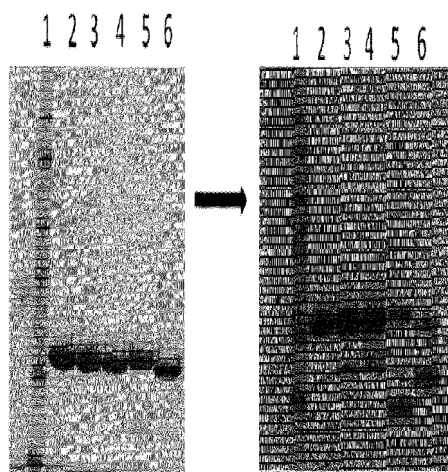
Фиг. 4В



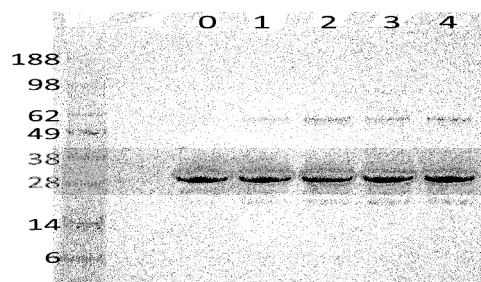
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

