

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092698** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.04.14

(22) Дата подачи заявки
2019.05.10

(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) **ИСКУССТВЕННЫЙ БЕЛОК, СОДЕРЖАЩИЙ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ
ОБЛАСТЬ АНТИТЕЛА, СЛИТЫЙ С БИОАКТИВНЫМИ ПЕПТИДАМИ**

(31) **62/669,468**

(32) **2018.05.10**

(33) **US**

(86) **PCT/JP2019/018839**

(87) **WO 2019/216436 2019.11.14**

(71) Заявитель:

МИРАБАЙОЛОДЖИКС ИНК. (JP)

(72) Изобретатель:

Такаги Дзунити, Хираи Хиденори (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к искусственному белку, представленному в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность, белка, имеющего, по меньшей мере, антигенсвязывающую область антитела, и слитому с физиологически активным пептидом в участке, экспонированном на поверхности белка.

A1

202092698

202092698

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566027EA/061

ИСКУССТВЕННЫЙ БЕЛОК, СОДЕРЖАЩИЙ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ ОБЛАСТЬ АНТИТЕЛА, СЛИТЫЙ С БИОАКТИВНЫМИ ПЕПТИДАМИ

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к искусственному белку, содержащему антигенсвязывающую область антитела и слитому с биоактивным пептидом, и т.п.

Уровень техники

[0002] Антитело имеет в основном функцию специфического связывания только с одной молекулой антигена в качестве молекулы-мишени. Известно антитело, узнающее две или более, соответственно, различных молекул антигенов (мультиспецифическое антитело: MsAb), в качестве модифицированного типа антитела, полученного способом белковой инженерии.

MsAb представляет собой антитело, одновременно связывающееся с двумя или более молекулами-мишенями, так что его можно использовать в качестве лекарственного средства, перекрестно связывающего клетки различных видов, например, клетки злокачественных опухолей и лимфоциты, и таким образом, проявляющего противораковую активность. Кроме того, MsAb, полученное посредством придания антителу, имеющему первую специфичность связывания, присущую антителу, второй специфичности связывания, может накапливаться в желательных тканях или клетках. В отличие от лекарственного средства с использованием общепринятого моноклонального антитела, имеющего способность связывания·способность ингибирования только против единственной мишени, MsAb является способным контролировать заболевание посредством комплексного механизма действия, и таким образом, его рассматривают как важное в качестве ведущего лекарственного средства на основе антитела следующего поколения.

[0003] В качестве формы MsAb, биспецифическое антитело (BsAb), полученное с использованием, в комбинации, двух узнающих антиген областей Fab, полученных из соответственно различных антител, является основной тенденцией, однако, в BsAb типа IgG, специальная сконструированная модификация является необходимой для гетеродимеризации тяжелых цепей, происходящих из соответственно различных антител (Непатентный документ 1). В технологии, называемой Fcab, получают BsAb типа IgG посредством введения второй специфичности связывания в Fc, область, отличную от области Fab, чтобы избежать проблем с гетеродимеризацией (Непатентный документ 2). В Fcab, поскольку область Fab все еще представляет собой область Fab из исходного антитела, первую специфичность связывания, которую исходно имеет антитело, сохраняют, и вторую специфичность связывания, включенную в Fc, просто добавляют к ней.

Однако, BsAb типа IgG требует сконструированной модификации высокого уровня и имеет множество сложностей с разработкой или продукцией, поскольку оно

представляет собой высокомолекулярный тип IgG (молекулярная масса: 150000). Кроме того, только одну специфичность связывания обычно добавляют к такому BsAb типа IgG. Таким образом, не существует примера достижения добавления третьей и четвертой специфичностей связывания.

[0004] В отличие от этих BsAb типа IgG, тандемный scFv (taFv), имеющий области Fv двух антител, связанные в сериях друг с другом в форме одноцепочечного типа scFv, разработан как BsAb, которое является более компактным и может быть легко получено посредством генной рекомбинации. Его используют в качестве противоракового иммунотерапевтического средства (привлекающего Т-клетки биспецифического активатора; ВІТЕ), позволяющего лимфоцитам накапливаться на клетках злокачественных опухолей и атаковать их (например, ссылка на Патентный документ 1). Однако, taFv является искусственным продуктом, имеющим структуру, сильно отличную от природного антитела, так что он имеет низкую стабильность *in vivo* (Непатентный документ 3). Кроме того, хотя, в принципе, три или более scFv можно связать друг с другом, ожидают, что полученное антитело может иметь более ухудшенную стабильность, так что количество добавленных специфичностей ограничено двумя в настоящее время.

С другой стороны, Fab, который является частью исходной молекулы антитела, состоит из четырех доменов, то есть, VH, VL, CH1 и CL, и его используют в течение долгих лет в качестве стабильного антигенсвязывающего белка, доступного посредством обработки IgG протеазой, такой как папаин. Антигенсвязывающий участок Fab (определяющая комплементарность область: называемая «CDR») имеет три области петель в верхней части каждой из VH и VL, всего шесть петель, так что существует пространство для сконструированной модификации областей, отличных от этих верхних частей. Это означает, что если новый биоактивный участок создают посредством модификации аминокислотной последовательности области, отличной от CDR, новую функцию, такую как свойство связывания второй мишени, можно придавать существующему антителу. Однако, даже если аминокислоты из областей этих петель рандомизируют для получения новой биоактивности, это обычно в большой степени уничтожает структурную стабильность, так что это является более сложным для получения, чем вышеописанные Fcab или taFv. В качестве общепринятого примера придания новой активности области Fab, известна только легкая цепь, имеющая слитый с С-концом биоактивный пептид или небольшой белок (Патентный документ 2).

Список литературы

Патентные документы

[0005] Патентный документ 1: Опубликованный перевод на японский Патентной заявки РСТ No. 2018-525347

Патентный документ 2: Опубликованный перевод на японский Патентной заявки РСТ No. 2011-509084

Непатентные документы

[0006] Непатентный документ 1: Nature Biotechnology, 1998; 16: 677-681

Непатентный документ 2: Protein Eng. Des. Sel., 2010; 23(4): 289-297

Непатентный документ 3: Clin. Pharmacokinet., 2016; 55: 1271-1288

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0007] Целью настоящего изобретения является предоставление нового искусственного белка, содержащего антигенсвязывающую область антитела и слитого с биоактивным пептидом.

Решение проблемы

[0008] Настоящее изобретение относится к следующему.

(1) Искусственный белок, имеющий биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

(2) Искусственный белок как описано в (1), сохраняющий антигенсвязывающую активность, происходящую из антитела, и наделенный функцией, происходящей из биоактивного пептида.

(3) Искусственный белок, как описано в (1) или (2), где биоактивный пептид представляет собой циклический пептид или линейный пептид.

(4) Искусственный белок, как описано в любом из (1) - (3), где белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой Fv, Fab, scFv, IgG, диатело или taFv.

(5) Искусственный белок, как описано в любом из (1) - (4), где участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, присутствует в области петли или в области изгиба в фрагменте Fab антитела (Fab).

В качестве области петли в фрагменте Fab антитела, предпочтительно, присутствует петля АВ (СН1), петля CD (СН1), петля EF (СН1), петля АВ (VН), петля С''D (VН), петля EF (VН), петля DE (СН1), петля FG (СН1) или петля СС' (VН), петля АВ (СL), петля CD (СL), петля EF (СL), петля АВ (VL), петля С''D (VL), петля EF (VL), петля DE (СL), петля FG (СL) или петля СС' (VL), в то же время область изгиба, предпочтительно, представляет собой петлю GA (VН-СН1) или петлю GA (VL-СL).

В фрагменте Fab антитела, в соответствии с нумерацией Chothia, область петли цепи Н, предпочтительно, представляет собой область, присутствующую в положениях 112-119, положениях 125-134, положениях 155-162, положениях 186-194, положениях 13-17, положениях 61-66, положениях 82b-87, положениях 172-174, положениях 201-203 или положениях 40-44, и область петли цепи L, предпочтительно, представляет собой область, присутствующую в положениях 105-113, положениях 119-128, положениях 151-158, положениях 182-190, положениях 13-18, положениях 57-61, положениях 76-83, положениях 165-174, положениях 198-203 или положениях 39-44.

(5-1) Искусственный белок, описанный в (5), где участок вставки в области петли антитела представляет собой участок В1, В2, В2_2, В3, М1, М2, М2-2, М3, М3-2, М4, М5, М5-2 или М6 в легкой цепи (цепи L), показанный на фиг. 7 и фиг. 8; или участок В1, В2, В2_2, В3, М1, М2, М2-2, М3, М3-2, М4, М5 или М6 в тяжелой цепи (цепи H), показанный на фиг. 14 и фиг. 15.

(5-2) Искусственный белок, как описано в (5), где участок вставки в области изгиба антитела представляет собой участок изгиба в цепи L, показанный на фиг. 7, или участок изгиба в цепи H, показанный на фиг. 14.

(6) Искусственный белок, как описано в любом из (1) - (5-2), имеющий мультиспецифичность.

(7) Способ представления биоактивного пептида на белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, включающий слияние биоактивного пептида с участком белка, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

(8) Способ представления биоактивного пептида на белке, как описано в (7), включающий обеспечение сохранения белком антигенсвязывающей активности, происходящей из антитела, и придание белку функции, происходящей из биоактивного пептида.

(9) Способ представления биоактивного пептида на белке, как описано в (7) или (8), где биоактивный пептид представляет собой циклический пептид или линейный пептид.

(10) Способ представления биоактивного пептида на белке, как описано в любом из (7) - (9), где белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой Fv, Fab, scFv, IgG, диатело или taFv.

(11) Способ представления биоактивного пептида на белке, как описано в любом из (7) - (10), где участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, присутствует в области петли или в области изгиба в фрагменте Fab антитела (Fab).

В качестве области петли в фрагменте Fab антитела, предпочтительно, присутствует петля АВ (СН1), петля CD (СН1), петля EF (СН1), петля АВ (VН), петля С''D (VН), петля EF (VН), петля DE (СН1), петля FG (СН1) или петля СС' (VН), петля АВ (СL), петля CD (СL), петля EF (СL), петля АВ (VL), петля С''D (VL), петля EF (VL), петля DE (СL), петля FG (СL) или петля СС' (VL), в то же время область изгиба, предпочтительно, представляет собой петлю GA (VН-СН1) или петлю GA (VL-СL).

В фрагменте Fab антитела, в соответствии с нумерацией Chothia, область петли цепи H, предпочтительно, представляет собой область, присутствующую в положениях 112-119, положениях 125-134, положениях 155-162, положениях 186-194, положениях 13-17, положениях 61-66, положениях 82b-87, положениях 172-174, положениях 201-203 или

положениях 40-44, и область петли цепи L, предпочтительно, представляет собой область, присутствующую в положениях 105-113, положениях 119-128, положениях 151-158, положениях 182-190, положениях 13-18, положениях 57-61, положениях 76-83, положениях 165-174, положениях 198-203 или положениях 39-44.

(11-1) Способ представления биоактивного пептида на белке как описано в (11), где участок вставки в области петли антитела представляет собой участок В1, В2, В2_2, В3, М1, М2, М2-2, М3, М3-2, М4, М5, М5-2 или М6 в цепи L, показанный на фиг. 7 и фиг. 8; или участок В1, В2, В2-2, В3, М1, М2, М2-2, М3, М3-2, М4, М5, или М6 в цепи H, показанный на фиг. 14 и фиг. 15.

(11-2) Способ представления биоактивного пептида на белке, как описано в (11), где участок вставки в области изгиба антитела представляет собой участок изгиба в цепи L, показанный на фиг. 7, или участок изгиба в цепи H, показанный на фиг. 14.

Обеспечивающие преимущество эффекты изобретения

[0009] В соответствии с настоящим изобретением, можно получать новый искусственный белок, включающий антигенсвязывающую область антитела и слитый с биоактивным пептидом.

Краткое описание чертежей

[0010] На фиг. 1 показана пространственная структура 1HZN, представляющего собой антитело IgG человека. Область, соединяющая домен VH и домен CH1, и область, соединяющая домен VL и домен CL, в области Fab, цепи H в цепи L антитела, соответственно, показана, как область изгиба.

На фиг. 2 схематически показаны соответствующие структуры антитела, Fab и scFv, в качестве примера белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела. Показаны структуры Fab и scFv, происходящие из тяжелой цепи и легкой цепи, в то же время приведенные в соответствие со структурой тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Среди них, scFv представляет собой одноцепочечный фрагмент варибельной области, в котором варибельная область (Fv) состоит из домена VH, происходящего из тяжелой цепи, и домена VL, происходящего из легкой цепи, соединенных посредством гибкого пептидного линкера (показанного как линкер). Кроме того, на этом чертеже схематически показаны способы связывания антитела, Fab и scFv с антигеном.

На фиг. 3 схематически показаны структуры BsAb в качестве примера белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела. Этот BsAb имеет структуру, использующую существующие антитело или фрагмент антитела, и структура может иметь множество различных дизайнов.

На фиг. 4 схематически показаны асимметричные структуры BsAb в качестве примера белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела.

На фиг. 5 схематически показаны симметричные структуры BsAb в качестве примера белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела.

На фиг. 6 показан участок вставки биоактивного пептида в цепи L. Номер

аминокислотного остатка соответствует нумерации на основании номера аминокислотного остатка по Chothia. Вставленный биоактивный пептид соответствует аминокислотной последовательности mP6-9.

На фиг. 7 показана пространственная структура области Fab 1HZN, антитела IgG человека. Структура, расположенная на ближней стороне, показывает цепь L, и структура, расположенная на дальней стороне, показывает цепь H. В качестве участков вставки биоактивного пептида в цепи L, показаны участок изгиба (E), участок B1, участок B2, участок B2-2 и участок B3.

На фиг. 8 показана пространственная структура области Fab 1HZN, антитела IgG человека. Она представляет собой чертеж, полученный посредством поворота пространственной структуры области Fab, показанной на фиг. 7, на 180°. Структура, расположенная на ближней стороне, показывает цепь H, и структура, расположенная на дальней стороне, показывает цепь L. В качестве участков вставки биоактивного пептида в цепи L, показаны участок M1, участок M2, участок M2-2, участок M3, участок M3-2, участок M4, участок M5, участок M5-2 и участок M6.

На фиг. 9 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab) моноклонального антитела IgG1 человека (антитела N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, имеющего пептид mP6-9, вставленный в каждый участок цепи L.

На фиг. 10 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab с плексином B1 (hPlexB1).

На фиг. 11 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 12 показаны результаты теста осаждения с использованием антитела против метки FLAG для связывания слитого с пептидом P6-9 белка типа N1_Fab с hPlexB1 и Nrp1ec.

На фиг. 13 показан участок вставки биоактивного пептида в цепи H. Номер аминокислотного остатка соответствует нумерации на основании номера аминокислотного остатка по Chothia. Вставленный биоактивный пептид соответствует аминокислотной последовательности mP6-9.

На фиг. 14 показана пространственная структура области Fab 1HZN, антитела IgG человека, сходного с антителом из фиг. 8. Структура, расположенная на ближней стороне, показывает цепь H, и структура, расположенная на дальней стороне, показывает цепь L. В качестве участков вставки биоактивного пептида в цепи H, показаны участок изгиба (E), участок B1, участок B2, участок B2-2 и участок B3.

На фиг. 15 показана пространственная структура области Fab 1HZN, антитела IgG человека, сходного с антителом из фиг. 7. Структура, расположенная на ближней стороне, показывает цепь L, и структура, расположенная на дальней стороне, показывает цепь H. В качестве участков вставки биоактивного пептида в цепи H показаны участок M1, участок M2, участок M2-2, участок M3, участок M3-2, участок M4, участок M5 и участок M6.

На фиг. 16 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab) моноклонального антитела IgG1 человека (антитела N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, имеющего пептид mP6-9, вставленный в каждый участок цепи H.

На фиг. 17 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab с плексином B1 (hPlexB1).

На фиг. 18 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 19 показаны результаты теста осаждения с использованием антитела против метки FLAG для связывания слитого с пептидом P6-9 белка типа N1_Fab с hPlexB1 и Nrp1ec.

На фиг. 20 показан принцип сэндвич-системы для измерения (A), показывающий одновременное связывание двух молекул-мишеней, и результаты измерения (B). На фиг. 20A показана вставка биоактивного пептида в тяжелую цепь.

На фиг. 21 показаны результаты теста осаждения с р-белком A для экспрессии моноклонального антитела IgG1 человека (антитела N1, наименование клона: YW64.3) (слитого с пептидом mP6-9 белка типа антитела N1) против нейропилина 1, имеющего пептид mP6-9, вставленный в каждый участок цепи L.

На фиг. 22 показаны результаты теста осаждения с р-белком A для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа антитела N1 с плексином B1 (hPlexB1).

На фиг. 23 показаны результаты теста осаждения с р-белком A для связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа антитела N1 с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 24 показан участок вставки биоактивного пептида в цепи L. Номер аминокислотного остатка соответствует нумерации на основании номеров аминокислотных остатков по Chothia. Вставленный биоактивный пептид соответствует аминокислотной последовательности aMD4.

На фиг. 25 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab) моноклонального антитела IgG1 человека (антитела N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, имеющего пептид aMD4, вставленный в каждый участок цепи L.

На фиг. 26 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 27 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 28 показан участок вставки биоактивного пептида в цепи H. Номер аминокислотного остатка соответствует нумерации на основании номеров аминокислотных остатков по Chothia. Вставленный биоактивный пептид соответствует аминокислотной последовательности aMD4.

На фиг. 29 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab) моноклонального антитела IgG1 человека

(антитела N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, имеющего пептид aMD4, вставленный в каждый участок цепи H.

На фиг. 30 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 31 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для связывания слитого с пептидом aMD4 белка типа N1_Fab с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 32 показан принцип (A) сэндвич-системы для измерения показывающий одновременное связывание двух видов молекул-мишеней, и результаты измерения (B). На фиг. 32A показана вставка биоактивного пептида в тяжелую цепь.

На фиг. 33 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом aMD4 белка типа ОКТ3_Fab или слитого с пептидом aMD5 белка типа ОКТ3_Fab) антитела против CD3 (ОКТ3), имеющего пептид aMD4 или пептид aMD5, вставленный в каждый участок цепи L или цепи H.

На фиг. 34 показаны результаты теста осаждения метки РА для связывания слитого с пептидом aMD4 или aMD5 белка типа ОКТ3_Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 35 показаны результаты оценки, посредством FACS, связывания слитого с пептидом aMD4 белка типа ОКТ3_Fab с экспрессирующими CD3 или Met клетками.

На фиг. 36 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом aMD4 белка типа UCНТ1_Fab или слитого с пептидом aMD5 белка типа UCНТ1_Fab) антитела против CD3 (UCНТ1), имеющего пептид aMD4 или пептид aMD5, вставленный в каждый участок цепи L или цепи H.

На фиг. 37 показаны результаты теста осаждения метки РА для связывания слитого с пептидом aMD4 или aMD5 белка типа UCНТ1_Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 38 показаны результаты оценки, посредством FACS, связывания слитого пептида aMD4 или пептида aMD5 UCНТ1_Fab с экспрессирующими CD3 или Met клетками.

На фиг. 39 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (слитого с пептидом aMD4 белка типа 3G8_Fab или слитого с пептидом aMD5 белка типа 3G8_Fab) антитела против CD16 (3G8), имеющего пептид aMD4 или пептид aMD5, вставленный в каждый участок цепи L или цепи H.

На фиг. 40 показаны результаты теста осаждения метки РА для связывания слитого с пептидом aMD4 или aMD5 белка типа 3G8_Fab с рецептором CD16 (CD16).

На фиг. 41 показаны результаты теста осаждения метки РА для связывания слитого с пептидом aMD4 или aMD5 белка типа 3G8_Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 42 показаны результаты теста осаждения на Ni-NTA для экспрессии Fab (триспецифического Fab) моноклонального антитела IgG1 человека (N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, имеющего пептид mP6-9 и пептид aMD4, вставленный в каждый участок цепи L или цепи H.

На фиг. 43 показаны результаты теста осаждения с использованием NZ-1 для связывания триспецифического Fab с нейропилином 1 (Nrp1ec).

На фиг. 44 показаны результаты связывания триспецифического Fab с плексином В1 (hPlexB1).

На фиг. 45 показаны результаты связывания триспецифического Fab с рецептором Met (Met).

На фиг. 46 показан принцип (А) сэндвич-системы для измерения, показывающий одновременное связывание двух видов молекул-мишеней с триспецифическим Fab, и результаты измерения (В).

На фиг. 47 показана аминокислотная последовательность цепи Н моноклонального антитела IgG1 человека (антитела N1, наименование клона: YW64.3) против нейропиллина 1.

На фиг. 48 показана аминокислотная последовательность области Fab цепи Н антитела N1, продуцированной с использованием экспрессирующего вектора для области Fab цепи Н антитела, описанного в примере.

На фиг. 49 показана аминокислотная последовательность цепи Lk антитела N1, продуцированной с использованием экспрессирующего вектора для цепи Lk антитела, описанного в примере.

Описание вариантов осуществления

[0011] Настоящее изобретение описано более конкретно посредством способов осуществления изобретения. Настоящее изобретение не ограничено следующими способами осуществления настоящего изобретения, но может быть осуществлено после различных модификаций.

[0012] [Искусственный белок]

Искусственный белок по настоящему изобретению имеет биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

Искусственный белок по настоящему изобретению имеет антигенсвязывающую область антитела. Искусственный белок по настоящему изобретению имеет антигенсвязывающую область, так что искусственный белок сохраняет структуру, имеющую антигенсвязывающую активность, в качестве структуры искусственного белка, на основе антигенсвязывающей области.

Искусственный белок по настоящему изобретению имеет, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность, свернутую часть вторичной структуры, и эта свернутая часть имеет в ней участок, экспонированный на поверхности белка, в качестве пространственной структуры белка.

По настоящему изобретению, биоактивный пептид является слитым с участком, экспонированным на поверхности белка.

Все из свернутых частей вторичной структуры могут являться экспонированными на поверхности белка, или некоторые из свернутых частей вторичной структуры могут

являться экспонированными на поверхности белка.

[0013] Антитело обычно имеет две верхние части, состоящие из 6 CDR, присутствующих в цепях H и L. По настоящему изобретению, примеры антигенсвязывающей области антитела, которую белок имеет по меньшей мере, включают верхнюю часть, состоящую из 6 CDR в цепях H и L. Хотя антитело имеет две верхние части, искусственный белок по настоящему изобретению может иметь одну такую верхнюю часть.

Примеры белка, имеющего такую верхнюю часть, включают антитела. Хотя антитела не являются конкретно ограниченными, их можно классифицировать на пять видов, то есть, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE.

Когда белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой антитело по настоящему изобретению, любое из IgG, IgM, IgA, IgD и IgE можно использовать в качестве антитела, но IgG является предпочтительным. Ряд подклассов известны как подкласс IgG, и можно выбирать из них.

Применительно к антителу, не наложено конкретного ограничения на то, откуда антитело происходит, и оно может представлять собой антитело мыши, антитело крысы, антитело кролика, антитело лошади, антитело собаки, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

[0014] Белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, может представлять собой фрагмент антитела, как описано выше, и примеры включают Fv, Fab, scFv, диатело и taFv.

Следует отметить, что белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, может представлять собой структуру, показанную на ФИГ. 2-5.

Fv, Fab, scFv, диатело или taFv может представлять собой фрагмент антитела, который можно понимать как структуру, уже известную на предшествующем уровне техники.

[0015] Искусственный белок по настоящему изобретению имеет биоактивный пептид, слитый со структурной областью, имеющей антигенсвязывающую активность, и искусственный белок, предпочтительно, сохраняет антигенсвязывающую активность, которую белок имеет перед слиянием с биоактивным пептидом.

Термин «искусственный белок сохраняет антигенсвязывающую активность», в рамках изобретения, означает, что даже после слияния искусственного белка с биоактивным пептидом, полученный искусственный белок сохраняет антигенсвязывающую активность на то время, когда он являлся интактным белком. В этом случае, антигенсвязывающая активность может различаться по степени до и после слияния с биоактивным пептидом.

По настоящему изобретению, антигенсвязывающая активность, предпочтительно, представляет собой антигенсвязывающую активность антитела, когда белок, имеющий антигенсвязывающую область антитела, рассматривают как антитело.

[0016] Искусственный белок по настоящему изобретению, слитый с биоактивным

пептидом, предпочтительно, имеет функцию, происходящую из биоактивного пептида.

Искусственный белок по настоящему изобретению, предпочтительно, сохраняет свою антигенсвязывающую активность и имеет функцию, происходящую из биоактивного пептида, слитого таким образом. Когда искусственный белок по настоящему изобретению сохраняет свою антигенсвязывающую активность и имеет функцию, происходящую из биоактивного пептида, слитого таким образом, искусственный белок по настоящему изобретению можно рассматривать как искусственный белок, имеющий мультиспецифичность.

В качестве предпочтительного способа, настоящее изобретение может относиться к технологии инженерии собственно аутентичного антитела, включающей придание второй специфичности связывания периферии области F_v посредством биоактивного пептида, подлежащего слиянию.

Термин «область F_v», в рамках изобретения, обозначает независимую структурную область, состоящую из домена V_H цепи H и домена V_L цепи L.

[0017] По настоящему изобретению, искусственный белок, имеющий антигенсвязывающую область антитела, может представлять собой искусственный белок, имеющий, в дополнение к функции, происходящей из антигенсвязывающей области антитела, новую функцию, поскольку он имеет биоактивный пептид, слитый с участком, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка. Более конкретно, в предпочтительном варианте, искусственный белок представляет собой подобный антителу белок, имеющий новую функцию, происходящую из биоактивного пептида, поскольку искусственный белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, имеет свойство связывания антигена, которое по существу имеет антитело, и кроме того, он имеет биоактивный пептид, слитый поблизости от антигенсвязывающей области.

Соответственно, когда искусственный белок по настоящему изобретению имеет свойство связывания антигена, которое по существу имеет антитело, и кроме того, имеет новую функцию, происходящую из биоактивного пептида, слитого с ним, он представляет собой искусственный белок, имеющий по меньшей мере двойную специфичность.

Предпочтительно, искусственный белок по настоящему изобретению сохраняет антигенсвязывающую активность, происходящую из антитела, и имеет функцию, происходящую из биоактивного пептида, слитого с ним, и таким образом, имеет мультиспецифичность. Искусственный белок по настоящему изобретению может иметь свойство связывания двойного антигена, которую по существу имеет антитело, и/или искусственный белок по настоящему изобретению может иметь мультиспецифичность, поскольку он имеет множество биоактивных пептидов, слитых с ним, и два или более соответственно различных биоактивных пептидов, имеющих две или более соответственно различных биоактивности.

[0018] В белковой инженерии, чтобы придать конкретному белку, включая

антитело, конкретную активность связывания, является обычной практикой использование способа получения библиотеки на основе белка, посредством рандомизации множества петель, близких друг к другу в белке, и получения продукта, связывающегося с молекулой-мишенью, из библиотеки. Также для Fcab, используют способ рандомизации петель в двух или трех положениях.

Настоящее изобретение обеспечивает преимущества в том, что биоактивный пептид можно сливать с белком посредством слияния биоактивного пептида с участком, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, без использования способа из предшествующего уровня техники.

В искусственном белке по настоящему изобретению, структура, слитая с участком, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, может, предпочтительно, представлять собой только аминокислотную структуру, происходящую из биоактивного пептида.

[0019] [Биоактивный пептид]

Хотя биоактивный пептид, подлежащий слиянию с искусственным белком, не является конкретно ограниченным, он, предпочтительно, представляет собой циклический пептид или линейный пептид.

Термин «биоактивный пептид» обозначает пептид, имеющий определенную биоактивность, и биологическая активность не является конкретно ограниченной.

Биоактивность биоактивного пептида, предпочтительно, представляет собой активность связывания с желательной молекулой, более предпочтительно, активность связывания с желательной молекулой-мишенью. Активность связывания может активировать активность молекулы посредством связывания с ней, ингибировать активность молекулы, или может контролировать активность молекулы.

Биоактивный пептид может представлять собой ингибитор, активатор или пептид, классифицированный как антагонист или агонист. Можно также сказать, что биоактивный пептид представляет собой пептид, имеющий активность связывания с определенной молекулой-мишенью, только за счет биоактивного пептида.

Молекула-мишень не является конкретно ограниченной, но она, предпочтительно, представляет собой молекулу, которая становится мишенью для лекарственных средств, и ее примеры включают рецепторы и ферменты.

Применительно к интенсивности биоактивности, биоактивный пептид может иметь активность порядка пМ, активность порядка нМ, активность порядка мкМ или активность порядка мМ, при выражении как значение K_d или значение EC_{50} , но он имеет предпочтительно активность порядка нМ или менее.

Применительно к биоактивности, биоактивный пептид может иметь усиленную или ослабленную активность, в результате слияния с искусственным белком.

Когда биоактивный пептид является слитым с искусственным белком по

настоящему изобретению, полная длина аминокислотной последовательности, как известно, имеющей биоактивность, может являться слитой с искусственным белком, или ее частичная последовательность может являться слитой с ним.

Когда частичная последовательность биоактивного пептида является слитой, частичная последовательность, предпочтительно, выбрана, чтобы сохранять биоактивность биоактивного пептида.

Когда биоактивный пептид является слитым в форме частичной последовательности, он может являться слитым таким образом, чтобы сохранять свою биоактивность, посредством его представления на поверхности искусственного белка. Иными словами, биоактивный пептид, имеющий частичную последовательность и имеющий более слабую биоактивность, чем полноразмерный пептид, также является предпочтительным вариантом настоящего изобретения, когда он является слитым с искусственным белком для сохранения биоактивности, которую по существу имеет биоактивный пептид.

[0020] Когда биоактивный пептид представляет собой циклический пептид, он, предпочтительно, является слитым с искусственным белком в форме цепи пептида, полученной посредством расщепления специфической связи в циклической структуре циклического пептида.

Участок расщепления специфической связи в циклическом пептиде, предпочтительно, представляет собой участок, сохраняющий биоактивность после слияния участка расщепления с белком.

Полная длина аминокислотной последовательности, когда полная длина циклического пептида выражена в форме цепи пептида, может являться слитой с искусственным белком, или частичная последовательность аминокислотной последовательности может являться слитой с искусственным белком.

Иными словами, биоактивный пептид, имеющий активность связывания с желательной молекулой, предпочтительно, сливаются, в то же время сохраняя активность связывания с желательной молекулой.

[0021] Когда биоактивный пептид вставлен в искусственный белок, аминокислотная часть, происходящая из искусственного белка, может являться слитой напрямую с аминокислотной частью, происходящей из биоактивного пептида, или они могут являться слитыми друг с другом посредством конкретного линкера.

Хотя линкер не является конкретно ограниченным, в той степени, в которой он может связывать биоактивный пептид с исходным белком, имеющим по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, он имеет, предпочтительно, биологически не активную аминокислотную последовательность.

Линкер, предпочтительно, имеет последовательность, имеющую одну или две, или более аминокислот, таких как глицин и серин, связанные друг с другом.

Биоактивный пептид не является конкретно ограниченным и, например, представляет собой пептид, имеющий от 5 до 20 аминокислот.

[0022] Когда биоактивный пептид является слитым, он может иметь все аминокислоты биоактивного пептида, или одна или более аминокислот могут являться замененными, делетированными или вставленными в пределах такого диапазона, как сохранение биоактивности.

Термин «один или более» может представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, в пределах диапазона от 1 до 10, или от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, 1 или 2, или 1.

Когда биоактивный пептид является слитым в форме его мутанта, мутант может являться слитым в форме аминокислотной последовательности, имеющей гомологию последовательности 70% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, или 95% или более, с аминокислотной последовательностью, которую имеет исходный биоактивный пептид, в той степени, в которой биоактивность не исчезает.

[0023] Когда биоактивный пептид представляет собой циклический пептид, он может представлять собой природный циклический пептид, пептид, полученный общепринятым способом мРНК-дисплея, пептид, полученный способом TRAP или способом RaPID, или пептид, полученный способом фагового дисплея. Альтернативно, он может представлять собой пептид, полученный посредством его модификации.

Циклический пептид содержит, например, тиоэфирную связь или дисульфидную связь, в качестве структуры для химического перекрестного связывания для формирования внутримолекулярной циклической структуры.

Обычно, в циклическом пептиде, отобранном способом мРНК-дисплея, таким как способ RaPID или способ TRAP, или способ фагового дисплея, структура, отличная от структуры для химического перекрестного связывания, для формирования внутримолекулярной циклической структуры, такая как тиоэфирная связь или дисульфидная связь, часто представляет собой активный участок, имеющий биоактивность.

Затем, является предпочтительным предполагать кажущийся линейный пептид, полученный посредством расщепления тиоэфирной связи или дисульфидной связи циклического пептида, и полученный линейный пептид сливать с искусственным белком. В этом случае, высокую специфичность и аффинность циклического пептида, полученного способом мРНК-дисплея, таким как способ RaPID или способ TRAP, или способ фагового дисплея, можно обычно придавать желательной структуре желательного искусственного белка. Хотя это не является конкретно ограниченным, циклический пептид, доступный посредством способа мРНК-дисплея, такого как способ RaPID или способ TRAP, или способ фагового дисплея, можно сливать с разнообразием молекул посредством слияния циклического пептида, имеющего тиоэфирную связь или дисульфидную связь, в качестве внутримолекулярной циклической структуры.

[0024] Хотя циклический пептид не является конкретно ограниченным, можно использовать природный циклический пептид, или можно использовать неприродный пептид.

Для слияния природного циклического пептида в искусственном белке, можно использовать любую связь, поскольку любую связь для связывания аминокислотных остатков друг с другом рассматривают в качестве структуры для химического перекрестного связывания, для формирования внутримолекулярной циклической структуры. Однако, является предпочтительным, чтобы связывание аминокислотных остатков в области, отличной от области циклического пептида, рассматриваемой в качестве активного участка, предпочтительно, формировалось в качестве структуры для химического перекрестного связывания, для слияния с искусственным белком.

[0025] Циклический пептид представляет собой пептид, имеющий, в своей молекуле, по меньшей мере циклическую структуру, состоящую из четырех или более аминокислотных остатков. Циклическая структура в циклическом пептиде, состоящая из четырех или более аминокислотных остатков, представляет собой кольцевую-замкнутую структуру из линейного пептида, сформированную в его молекуле посредством связывания двух аминокислотных остатков, отделенных друг от друга двумя или более аминокислотами, напрямую или посредством линкера или т.п.

Термин «два аминокислотных остатка, разделенные двумя или более аминокислотами», имеет такое же значение, как присутствие по меньшей мере двух аминокислотных остатков между двумя аминокислотными остатками. Два аминокислотных остатка являются связанными друг с другом, с двумя или более аминокислотами между ними.

[0026] По настоящему изобретению, биоактивный пептид является слитым с участком, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, однако, количество аминокислот, составляющих биоактивный пептид, слитый таким образом, не является конкретно ограниченным.

Является предпочтительным, чтобы искусственный белок по настоящему изобретению сохранял антигенсвязывающую активность, так что слияние биоактивного пептида, достаточное для лишения структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность, антигенсвязывающей активности, не является желательным.

Нижний предел количества аминокислот биоактивного пептида не является конкретно ограниченным, но он может составлять 4, в то время как верхний предел не является конкретно ограниченным, но он может составлять 30 или менее, 25 или менее, или 20 или менее.

В искусственном белке по настоящему изобретению, количество аминокислот может увеличиваться или уменьшаться после слияния биоактивного пептида.

[0027] [Белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела]

Искусственный белок по настоящему изобретению может также представлять собой слитый белок, полученный посредством вставки биоактивного пептида в белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела. Типичные примеры белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, включают

белки, показанные на фиг. 2-5. Он, предпочтительно, представляет собой Fv, Fab, scFv, IgG, диатело, или taFv, более предпочтительно, Fab, scFv или IgG.

Соответственно, антигенсвязывающая активность на основе антигенсвязывающей области антитела, предпочтительно, представляет собой антигенсвязывающую активность антитела или его производного в такой структуре, как Fv, Fab, scFv, IgG, диатело или taFv, перед его слиянием с биоактивным пептидом.

На фиг. 3-5 показаны биспецифические (мультиспецифические) антитела, отличающиеся в антигенсвязывающей области антитела, и эти биспецифические (мультиспецифические) антитела можно также привести в качестве примеров белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела по настоящему изобретению. Это означает, что белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, может представлять собой подобную антителу молекулу.

Фиг. 3-5 включают белки, отличающиеся в антигенсвязывающей области антитела, однако, белки, имеющие по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой белок, показанный на фиг. 3-5 и имеющий такой же антигенсвязывающий участок антитела.

[0028] [Участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка]

В искусственном белке по настоящему изобретению, биоактивный пептид является слитым с белком, имеющим по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, более конкретно, является слитым с участком белка, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

Участок аминокислотной последовательности, который соответствует свернутой части вторичной структуры в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и с которым биоактивный пептид является слитым, может присутствовать между аминокислотами, смежными друг с другом. Участок аминокислотной последовательности, который соответствует свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и с которым биоактивный пептид является слитым, может присутствовать между аминокислотами аминокислотной последовательности, отделенными друг от друга. Когда биоактивный пептид является слитым между аминокислотами, отделенными друг от друга, искусственный белок может терять одну или более аминокислот, присутствующих между аминокислотами аминокислотной последовательности, которые соответствуют свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность, выбранной для связывания биоактивного пептида.

Участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, предпочтительно, представляет собой участок, присутствующий в области петли

или в области изгиба фрагмента Fab антитела (Fab).

Участок, с которым биоактивный пептид является слитым, может быть произвольно выбран из области петли или области изгиба фрагмента Fab антитела.

[0029] Участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, может присутствовать в области Fv или вне области Fv. Когда участок находится вне области Fv, он, предпочтительно, присутствует в структурной области, неспособной стабильно существовать независимо от Fv, например, домен CH1 цепи H или домен CL цепи L фрагмента Fab антитела (Fab), присутствующий по соседству с областью Fv. В этом случае, является предпочтительным, чтобы независимый домен (например, область Fc антитела или искусственно слитый модуль Fn3), просто соединенный с Fv или Fab, не использовали в качестве участка, подлежащего слиянию с биоактивным пептидом.

[0030] По настоящему изобретению, участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, предпочтительно, представляет собой часть, называемую «область петли» антитела, или ее производное.

Примеры области петли антитела или ее производного включают, в цепи H, петлю GA (VH-CH1), петлю AB (CH1), петлю CD (CH1), петлю EF (CH1), петлю AB(VH), петлю C'D (VH), петлю EF (VH), петлю DE (CH1), петлю FG (CH1), и петлю CC' (VH) и включают, в цепи L, петлю GA (VL-CL), петлю AB (CL), петлю CD (CL), петлю EF (CL), петлю AB (VL), петлю C'D (VL), петлю EF (VL), петлю DE (CL), петлю FG (CL) и петлю CC' (VL).

Следует отметить, что предпочтительную область петли можно выбирать по необходимости, в зависимости от белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела. Когда белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой антитело или Fab, область петли можно выбирать из вышеописанных. Это означает, что можно выбирать область петли, присутствующую в структуре, которую имеет белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела.

[0031] По настоящему изобретению, как показано на фиг. 48 и 49, когда номера аминокислотных остатков описаны с использованием нумерации Chothia, области петель в цепи H, предпочтительно, представляют собой:

- петлю GA (VH-CH1): положения 112-119,
- петлю AB (CH1): положения 125-134,
- петлю CD (CH1): положения 155-162,
- петлю EF (CH1): положения 186-194,
- петлю AB (VH): положения 13-17,
- петлю C'D (VH): положения 61-66,
- петлю EF вар. 1 (VH): положения 82b-87,
- петлю DE (CH1): положения 172-174,

петлю FG (CH1): положения 201-203, и
 петлю CC' (VH): положения 40-44, и области петель в цепи L, предпочтительно, представляют собой:

петлю GA (VL-CL): положения 105-113,
 петлю AB (CL): положения 119-128,
 петлю CD (CL): положения 151-158,
 петлю EF (CL): положения 182-190,
 петлю AB (VL): положения 13-18,
 петлю C'D (VL): положения 57-61,
 петлю EF (VL): положения 76-83,
 петлю DE (CL): положения 165-174,
 петлю FG (CL): положения 198-203 и
 петлю CC' (VL): положения 39-44.

По настоящему изобретению, свернутая часть вторичной структуры в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность, предпочтительно, имеет структуру петли, которую можно идентифицировать посредством нумерации Chothia. Участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, может представлять собой либо полную структуру петли, либо часть структуры петли.

Это означает, что участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, может, предпочтительно, представлять собой участок в структуре петли, который можно идентифицировать посредством нумерации Chothia.

[0032] Можно привести описание с петлей GA (VH-CH1) в качестве примера, петлю GA (VH-CH1) определяют как аминокислоты в положениях 112-119, в соответствии с нумерацией Chothia. Хотя участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, не является конкретно ограниченным с использованием нумерации Chothia, его можно выбирать как участок от произвольного из положений 112, 113, 114, 115, 116, 117 и 118 до произвольного из положений 119, 118, 117, 116, 115, 114 и 113, например, в положениях 112-113, положениях 113-114, положениях 114-115, положениях 115-116, положениях 116-117, положениях 117-118, положениях 118-119, положениях 112-114, положениях 113-115, положениях 114-116, положениях 115-117, положениях 116-118, положениях 117-119, положениях 112-115, положениях 113-116, положениях 114-117, положениях 115-118, положениях 116-119, положениях 112-116, положениях 113-117, положениях 114-118, положениях 115-119, положениях 112-117, положениях 113-118, положениях 114-119, положениях 112-118 и положениях 113-119.

После выбора таким образом произвольного положения, белок можно связывать с

N-концевой стороной биоактивного пептида в положении, где номер аминокислоты на основе нумерации Chothia является маленьким, или белок можно связывать с C-концевой стороной биоактивного пептида в положении, где номер аминокислоты на основе нумерации Chothia является большим.

Петлю GA (VH-CH1) определяют как аминокислоты в положениях 112-119, в соответствии с нумерацией Chothia. Но если она представляет собой участок, экспонированный на поверхности белка, ее можно выбирать из положений с N-концевой стороны от положения 112 или, сходным образом, ее можно выбирать из положений с C-концевой стороны от положения 119.

[0033] По настоящему изобретению, в каждом из искусственных белков, можно выбирать структуру петли, соответствующую номеру аминокислоты, определенному посредством нумерации Chothia.

[0034] Участок вставки биоактивного пептида в области петли, предпочтительно, находится в участке B1, B2, B2-2, B3, M1, M2, M2-2, M3, M3-2, M4, M5, M5-2 или M6 в цепи L, показанной на фиг. 7 или фиг. 8; или в участке B1, B2, B2_2, B3, M1, M2, M2-2, M3, M3-2, M4, M5 или M6 в цепи H, показанной на фиг. 14 или фиг. 15.

В соответствии с фиг. 6, участок вставки является следующим (N1_mP6-9_M6_L).

...YQQKP⁴⁰-(GWRPYIERWTGRLIVGG)-G⁴¹KAPK... В соответствии с фиг. 13, участок вставки является следующим (N1_mP6-9_M6_H).

...VRQAP⁴¹-(GWRPYIERWTGRLIVGG)-G⁴²KGLE... Участок вставки биоактивного пептида в области изгиба, предпочтительно, находится в участке изгиба в цепи L, показанной на фиг. 7, или в участке изгиба в цепи H, показанной на фиг. 14.

На фиг. 7, фиг. 8, фиг. 14 и фиг. 15, каждый участок вставки показан, применительно к структуре антитела (1HZN). В случае другого антитела, участок другого антитела, соответствующий участку в антителе (1HZN), можно использовать в качестве участка вставки.

Примеры участка вставки биоактивного пептида включают участки, показанные на фиг. 6 и фиг. 13.

[0035] По настоящему изобретению, является предпочтительным, чтобы участки вставки в цепи H, в соответствии с нумерацией Chothia, представляли собой положения 113-114 в качестве участка E в петле GA (VH-CH1), положения 132-133 в качестве участка B1 в петле AB (CH1), положения 156-157 в качестве участка B2, и положения 160-161 в качестве участка B2-2, каждый в петле CD (CH1), положения 190-191 в качестве участка B3 в петле EF (CH1), положения 14-15 в качестве участка M1 в петле AB (VH), положения 61-62 в качестве участка M2, и положения 65-66 в качестве участка M2-2, каждый в петле C'D (VH), положения 82a-82b в качестве участка M3, и положения 83-84 в качестве участка M3-2, каждый в петле EF (VH), положения 172-173 в качестве участка M4 в петле DE (CH1), положения 203-204 в качестве участка M5 в петле FG (CH1), и положения 41-42 в качестве участка M6 в петле CC' (VH). Является предпочтительным, чтобы участки вставки в цепи L представляли положения 108-109 в качестве участка E в петле GA (VL-

CL), положения 127-128 в качестве участка В1 в петле АВ (CL), положения 151-152 в качестве участка В2, и положения 156-157 в качестве участка В2-2, каждый в петле CD (CL), положения 188-189 в качестве участка В3 в петле EF (CL), положения 15-16 в качестве участка М1 в петле АВ (VL), положения 56-57 в качестве участка М2, и положения 60-61 в качестве участка М2, каждый в петле С'D (VL), положения 76-77 в качестве участка М3, и положения 80-81 в качестве участка М3-2, каждый в петле EF (VL), положения 169-170 в качестве участка М4 в петле DE (CL), положения 202-203 в качестве участка М5, и положения 199-200 в качестве участка М502, каждый в петле FG (CL), и положения 40-41 в качестве участка М6 в петле СС' (VL).

Следует отметить, что на фиг. 6 и фиг. 13, цепь Н и цепь L показаны посредством присоединения нижних индексов Н и L, соответственно.

По настоящему изобретению, когда белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой антитело, Fab или т.п., участок В1, участок В2 или участок В3 является предпочтительным в цепи Н, в то время как участок В1, участок В2, участок В2-2 или участок В3 является предпочтительным в цепи L, где каждый участок становится так называемым нижним участком.

По настоящему изобретению, поскольку биоактивный пептид можно сливать поблизости от антигенсвязывающей области, участок вставки, отличный от так называемого нижнего участка, можно использовать предпочтительным образом.

В цепи Н, область петли, к которой принадлежит участок В1, участок В2 или участок В3, является предпочтительной, в то время как в цепи L, область петли, к которой принадлежит участок В1, участок В2, участок В2-2 или участок В3, является предпочтительной.

[0036] [Получение искусственного белка, имеющего биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка]

По настоящему изобретению, не наложено конкретного ограничения на способ получения искусственного белка, имеющего биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющего по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, и искусственный белок по настоящему изобретению можно получать с использованием способа, описанного в примере. Для получения, можно использовать общеизвестный способ генной инженерии или его модификацию.

Способ получения искусственного белка, имеющего биоактивный пептид, слитый, в белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, с участком, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, в соответствии с настоящим изобретением, включает:

выбор всех или некоторых из аминокислотных последовательностей, подлежащих слиянию с белком, из аминокислотных последовательностей биоактивного пептида, и выбор последовательностей оснований, соответствующих аминокислотным последовательностям;

выбор участка в белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка;

выбор последовательностей оснований, соответствующих двум аминокислотным остаткам, составляющим участок, с которым сливают биоактивный пептид, делецию оснований, присутствующих между выбранных таким образом последовательностей оснований, при необходимости, вставку и включение последовательностей оснований, соответствующих выбранным аминокислотным последовательностям, происходящим из биоактивного пептида, и получение таким образом нуклеиновой кислоты, имеющей полученную последовательность оснований; и

трансляцию нуклеиновой кислоты.

[0037] Настоящее изобретение также относится к способу представления биоактивного пептида на белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, то есть, к способу представления биоактивного пептида на белке посредством слияния биоактивного пептида с участком в белке, присутствующем в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

Поскольку в искусственном белке по настоящему изобретению, имеющем биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, «биоактивный пептид» является слитым с «участком в белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка», способ представления биоактивного пептида на белке можно предоставлять сходным образом, как описано для искусственного белка по настоящему изобретению.

Можно понять также, что по настоящему изобретению, «способ представления биоактивного пептида на белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела», представляет собой «способ слияния биоактивного пептида с белком, имеющим по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, для придания мультиспецифичности белку», посредством слияния биоактивного пептида с участком белка, присутствующем в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

Иными словами, белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область

антитела, предпочтительно, имеет мультиспецифичность посредством сохранения его активности связывания антигена, происходящей из антитела, и придания функции, происходящей из слитого биоактивного пептида.

Примеры

[0038] Настоящее изобретение далее конкретно описано посредством примеров, однако, следует отметить, что настоящее изобретение не является ограниченным следующими примерами.

[0039] Слияние области Fab, представляющей собой антигенсвязывающий участок, с биоактивным пептидом

Слитый с пептидом белок получали, как описано ниже, посредством вставки биоактивного пептида в область Fab, антигенсвязывающего участка, полноразмерного белка IgG (далее в настоящем описании обозначенного как «IgG»).

На фиг. 1 показана структура антитела (1HZN) в качестве примера. На фиг. 7, фиг. 8, фиг. 14 и фиг. 15 показан участок вставки биоактивного пептида, применительно к структуре антитела, показанной на фиг. 1.

[0040] [Пример 1]

1. Получение слитого с пептидом белка

ДНК, кодирующую область Fab цепи H моноклонального антитела IgG человека (антитело N1, наименование клона: YW64.3) против нейропилина 1, и ДНК, кодирующую метку Hisx6, вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific) (вектор, экспрессирующий область Fab цепи H антитела).

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2) области Fab цепи H антитела N1, продуцированная посредством полученного вектора, показана на фиг. 48. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 1) цепи H антитела N1 показана на фиг. 47.

ДНК, кодирующую полноразмерную область цепи Lk антитела N1, вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (вектор, экспрессирующий цепь Lk антитела). Ее вставляли без метки. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 3) цепи Lk антитела N1, продуцированная посредством полученного вектора, показана на фиг. 49.

В качестве биоактивного пептида, выбирали mP6-9, имеющий активность связывания с плексином B1 человека. mP6-9 представляет собой циклический пептид, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 4) D-Trp Arg Pro Tyr Ile Glu Arg Trp Thr Gly Arg Leu Ile Val и Cys, и его циклическая структура состоит из хлорацетилированного D-Trp и Cys. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 5) mP6-9, вставленная в каждый участок области Fab, представляет собой Trp Arg Pro Tyr Ile Glu Arg Trp Thr Gly Arg Leu Ile и Val.

Как показано на фиг. 6 и фиг. 13, Gly использовали в качестве линкера для N-конца и C-конца вставленной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 6-32).

Вектор для слияния цепи H антитела-пептида получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для области Fab цепи H антитела, участка изгиба (E)

области, или, в качестве области петли, участка B1, B2, B2-2, B3, M1, M2, M2-2, M3, M3-2, M4, M5 или M6, и вставки последовательности ДНК, соответствующей последовательности mP6-9, в участок. Например, вставку в участок изгиба (E) в цепи H осуществляли посредством вставки последовательности ДНК (SEQ ID NO: 20), кодирующей аминокислотную последовательность, включая последовательность mP6-9, в следующих скобках между серином (S) в положении 113 и аланином (A) в положении 114 (номер аминокислотного остатка, в соответствии с нумерацией Chothia), как показано ниже.

...VTVSS¹¹³-(GWRPYIERWTGRLIVG)-A¹¹⁴STKG...

Сходным образом, положение вставки в каждый участок в цепи H показано на фиг. 13.

Белки Fab, включающие слитый с пептидом белок типа цепи H антитела, получали посредством совместной экспрессии вектора для слияния цепи H антитела-пептида и экспрессирующего вектора для неслитой цепи Lк антитела, и они названы в следующем порядке: N1_Fab_(наименование пептида)_(наименование участка) (фиг. 16 - фиг. 18), например, N1_Fab_mP6-9_M1H.

Вектор для слияния цепи L антитела-пептида получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для цепи Lк антитела, участка изгиба (E) в области или, в качестве области петли, участка B1, B2, B2_2, B3, M1, M2, M2-2, M3, M3-2, M4, M5, M5-2 или M6, и вставки последовательности ДНК, соответствующей последовательности mP6-9, в участок. Например, вставку в участок изгиба (E) в цепи L осуществляли посредством вставки последовательности ДНК (SEQ ID NO: 6), кодирующей аминокислотную последовательность, включая последовательность mP6-9 в следующих скобках между аргинином (R) в положении 108 и треонином (T) в положении 109 (номер аминокислотного остатка в соответствии с нумерацией Chothia), как показано ниже.

...VEIKR¹⁰⁸-(GWRPYIERWTGRLIVG)-T¹⁰⁹VAAP...

Сходным образом, положение вставки в каждый участок в цепи L показано на фиг. 6.

Белки Fab, включающие слитый с пептидом белок типа цепи L антитела, получали посредством совместной экспрессии вектора для слияния цепи L антитела-пептида и экспрессирующего вектора для неслитой цепи области Fab цепи H антитела, и они названы в следующем порядке: N1_Fab_(наименование пептида)_(наименование участка) (фиг. 9 - фиг. 12), например, N1_Fab_mP6-9_M1L.

Слитый с пептидом белок типа цепи H антитела и слитый с пептидом белок типа цепи L показаны, соответственно, посредством нижних индексов H и L в наименовании участка.

Слитый с пептидом белок типа Fab (Fabbody), включая слитый с пептидом белок типа цепи H антитела или слитый с пептидом белок типа цепи L антитела, получали посредством совместной экспрессии вектора для слияния цепи H антитела-пептида и

экспрессирующего вектора для неслитой цепи Lκ антитела, или вектора для слияния цепи L антитела-пептида и экспрессирующего вектора для неслитой области Fab цепи H антитела, с использованием клеток Expi293F (продукт Thermo Fischer Scientific) и таким образом, секретиции продукта совместной экспрессии в культуральный супернатант. Культивирование и трансфекцию клеток проводили, следуя стандартному способу Thermo Fischer Scientific.

Образец получали посредством добавления 40 мкл Ni-NTA сефарозы (продукта Qiagen) к 0,25 мл собранного культурального супернатанта, перемешивания полученной смеси посредством вращения в течение 2 часов, осаждения сефарозы посредством разделения центрифугированием для удаления супернатанта, промывки сефарозы два раза с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавления 12,5 мкл 500 mM имидазола, имеющего pH 8,0, к TBS для элюции, добавления 12,5 мкл буфера для образцов с SDS дополнительно, и нагревания смеси при 95°C в течение 2 минут. Образец (5 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невосстанавливающих условиях и окрашивали с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 9 и фиг. 16.

[0041] 2. Связывание слитого с пептидом белка с молекулой-мишенью

Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет N1_Fab (слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab), полученный посредством слияния пептида mP6-9 с различными участками, сохраняет как способность связывания с нейропилином 1, которую антитело N1 имело до слияния, так и способность связывания с плексинном В1 человека, которую пептид mP6-9 имел до слияния. В соответствии со способом, описанным в Protein Exp. Purification, 2014; 95: 240-247, конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку РА (продукт Wako Pure Chemical Industries), добавленную к С-концу внеклеточной области плексина В1 человека и конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку РА, добавленную к С-концу внеклеточной области нейропилина 1 мыши, получали, и их вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific). Временную экспрессию вызывали в клетках Expi293F с использованием полученных векторов, в соответствии с вышеописанным способом, и получали культуральные супернатанты, содержащие плексин В1-РА и нейропилин 1-РА, каждый фрагмент растворимого рецептора.

Как описано выше, после связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab на сефарозе Ni-NTA, проводили реакцию культурального супернатанта, содержащего плексин В1-РА или нейропилин 1-РА, каждого полученного отдельно вышеописанным способом. После промывки сефарозы и элюции связавшегося белка, как описано выше, электрофорез проводили в невосстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 10 и фиг. 11, и фиг. 17, и фиг. 18.

Полученные таким образом данные показывают результаты теста, позволяющие

предполагать, что слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab имеет способность связывания как с нейропилином 1, так и с плексином В человека.

[0042] Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab имеет одновременную способность связывания с нейропилином 1 и плексином В1 человека.

Конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий добавленную к С-концу внеклеточной области нейропилина 1 мыши метку DYKDDDDK (SEQ ID NO: 33), получали, и полученную конструкцию вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific). Временную экспрессию проводили в клетках Expi293F с использованием вектора, в соответствии с вышеописанным способом, и получали культуральный супернатант, содержащий нейропилин 1-DYKDDDDK, фрагмент растворимого рецептора. Культуральный супернатант (0,25 мл), содержащий нейропилин 1-DYKDDDDK, связывали с 40 мкл бусин сефарозы с антителом против метки DYKDDDDK (продуктом Wako Pure Chemical Industries). После осаждения сефарозы посредством разделения центрифугированием для удаления супернатанта и промывки один раз с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавляли 0,25 мл культурального супернатанта, содержащего слитый с пептидом mP6-9 Fab. Их перемешивали посредством вращения в течение одного часа и подвергали реакции. Сефарозу снова осаждали посредством разделения центрифугированием и промывали один раз с использованием 1 мл TBS. Затем, добавляли 0,25 мл культурального супернатанта, содержащего плексин В1 человека-РА, и их подвергали реакции с использованием перемешивания посредством вращения в течение одного часа. Затем сефарозу промывали два раза с использованием 1 мл TBS. TBS (12,5 мкл) и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS добавляли для элюции, с последующим нагреванием при 95°C в течение 2 минут для получения образца. Образец (10 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невозстанавливающих условиях и окрашивали с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 12 и фиг. 19.

Полученные таким образом данные показывают результаты теста, позволяющие предполагать, что слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab имеет одновременную способность связывания с нейропилином 1 и плексином В человека.

[0043] 3. Одновременная способность связывания слитого с пептидом белка с двумя молекулами-мишенями

3-1. Принцип теста межмолекулярного перекрестного связывания типа сэндвича и получение антигена-мишени

Систему анализа типа сэндвич-ELISA конструировали, чтобы показать, что слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab может одновременно связываться с двумя видами молекул-мишеней. Принцип показан на фиг. 20А. Сначала, в соответствии со способом, описанным в Protein Exp. Purification, 2014; 95: 240-247, получали конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку РА (продукт Wako Pure Chemical Industries),

добавленную к С-концу внеклеточной области плексина В1 человека, в качестве второй молекулы-мишени, и полученную конструкцию вставляли в экспрессирующий вектор pсDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific). Временную экспрессию вызывали в клетках Expi293F с использованием полученного вектора, в соответствии со способом, сходным со способом, описанным выше в «2.», для получения культурального супернатанта, содержащего плексин В1-РА, фрагмент растворимого рецептора, с последующей очисткой с использованием бусин с антителом против метки РА (продукт Wako Pure Chemical Industries). Со стороны первого антигена, рАРtag-5 (продукт GenHunter), экспрессирующий вектор для слияния с АР, использовали для слияния последовательности его внеклеточной области с N-концевым (от нейропиллина 1) АР. Посредством временной экспрессии в клетках Expi293F в соответствии со способом, сходным со способом, описанным выше в «2», получали культуральный супернатант, содержащий Nrp1ec-АР, продукт слияния растворимого рецептора-АР.

[0044] 3-2. Тест межмолекулярного перекрестного связывания типа сэндвича

Перекрестное связывание между двумя молекулами-мишенями посредством слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab оценивали в соответствии со следующим способом, основанном на принципе, показанном на фиг. 20А.

(1) 50 мкл очищенного раствора второго антигена-мишени, разведенного до 10 мкг/мл, добавляли в 96-луночный планшет, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 3 часов.

(2) После удаления очищенного раствора второго антигена-мишени, добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора Blocking One (продукта Nacalai Tesque), разведенного в 10 раз с использованием TBS (TBS; 20 mM Трис-НCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), и планшету позволяли стоять в течение ночи при 4°C.

(3) Планшет промывали один раз с использованием 200 мкл/лунку TBS.

(3) Добавляли 50 мкл супернатанта после экспрессии слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_Fab, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 2,5 часов.

(4) Планшет промывали три раза с использованием 200 мкл/лунку TBS.

(5) Добавляли 50 мкл супернатанта после экспрессии слитого с АР первого антигена-мишени, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 2 часов.

(6) Планшет промывали четыре раза с использованием 200 мкл/лунку TBS и наконец, добавляли 100 мкл/лунку TBS.

(7) После того, как 100 мкл/лунку хромогенного субстрата (субстрата фосфатазы, продукта Sigma Aldrich) добавляли дополнительно, и планшету позволяли стоять при 37°C в течение 30 минут, измеряли оптическую плотность при 405 нм раствора в каждой лунке. Результаты показаны на фиг. 20В.

Слитый с пептидом mP6-9 белок типа N1_Fab связывался с планшетом, имеющим иммобилизованный на нем второй антиген-мишень, и связывался со слитым белком

первый антиген-мишень-АР, добавленным позднее, чтобы вызывать развитие окрашивания субстрата. С другой стороны, для N1_Fab, не имеющего вставленного пептида, не получали положительного сигнала. Это показывает, что Fabbody, слитый с пептидом белок типа Fab, является способным, не индивидуально, но одновременно связываться с первой и второй мишенями.

[0045] [Пример 2]

1. Получение слитого с пептидом белка

Слитый с пептидом белок типа IgG, содержащий слитый с пептидом белок типа цепи Н антитела или слитый с пептидом белок типа цепи L антитела, получали посредством совместной экспрессии вектора для слияния цепи Н антитела-пептида и экспрессирующего вектора для неслитой цепи Lк, или вектора для слияния цепи L антитела-пептида и экспрессирующего вектора для неслитой области цепи Н антитела IgG с использованием клеток Expi293F (продукта Thermo Fischer Scientific), и таким образом, секретиции продукта совместной экспрессии в культуральный супернатант.

Образец получали посредством добавления 40 мкл сефарозы с белком А (продукта GE Health Care) к 0,25 мл собранного культурального супернатанта, перемешивания полученной смеси посредством вращения в течение 1 часа, осаждения сефарозы посредством разделения центрифугированием для удаления супернатанта, промывки сефарозы два раза с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, рН 7,5), добавления 12,5 мкл TBS и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS для элюции, и нагревания при 95°C в течение 2 минут. Образец (5 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в восстанавливающих условиях и окрашивали с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 21.

[0046] 2. Связывание слитого с пептидом белка с молекулой-мишенью

Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет N1_IgG (слитые с пептидом mP6-9 белки типа N1_IgG), имеющие пептид mP6-9, слитый с их различными участками, сохраняли как способность связывания с нейропилином 1, которую антитело N1 имело до слияния, так и способность связывания с плексином В1 человека, которую пептид mP6-9 имел до слияния.

После связывания слитого с пептидом mP6-9 белка типа N1_IgG, с сефарозой с белком А, проводили реакцию с ним культурального супернатанта, содержащего плексин В1-РА или нейропилин 1-РА, полученного отдельно способом, сходным со способом из примера 1. После промывки сефарозы и элюции связавшегося белка, как описано выше, электрофорез проводили в восстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 22 и фиг. 23.

Полученные таким образом данные показывают результаты теста, позволяющие предполагать, что пептид mP6-9, слитый с IgG, имеет способность связывания как с нейропилином 1, так и с плексином В1 человека.

[0047] [Пример 3]

Настоящий пример осуществляли способом, сходным со способом из примера 1, за исключением того, что биоактивный пептид, mP6-9, имеющий активность связывания с плексином В1 человека, заменяли на aMD4, имеющий активность связывания с рецептором Met человека (Met).

aMD4 представляет собой циклический пептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 34): D-Tyr Arg Gln Phe Asn Arg Arg Thr His Glu Val Trp Asn Leu Asp Cys, в котором хлорацетилованный D-Tyr и Cys формируют циклическую структуру. aMD4, вставленный в каждый участок области Fab, имеет следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 35): Tyr Arg Gln Phe Asn Arg Arg Thr His Glu Val Trp Asn Leu Asp.

Как показано на фиг. 24 и фиг. 28, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 36-51), вставленная таким образом, имеет, на своем N-конце и C-конце, Gly, служащий линкером.

Результаты показаны на фиг. 25 - фиг. 27 и фиг. 29 - фиг. 32.

[0048] [Пример 4]1. Получение слитого с пептидом белка

Настоящий пример осуществляли, как пример 1, за исключением того, что в качестве белка Fab, антитело N1 заменяли на Fab из антитела против CD3 (антитела ОКТ3).

Векторы для слияния цепи Н антитела-пептида получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для области Fab цепи Н антитела ОКТ3, участков В1, В2, В2-2 и В3 в качестве области петли, и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности aMD4 или последовательности aMD5, используемой в примере 3. Векторы для слияния цепи L антитела-пептида получали посредством выбора участков В1, В2, В2_2 и В3 в качестве области петли, на основе экспрессирующего вектора для цепи Lк антитела ОКТ3, и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности aMD4 или последовательности aMD5. Участок вставки биоактивного пептида в цепи Н или цепи L представляет собой участок, соответствующий участку в Fab антитела ОКТ3, в соответствии с участком вставки, показанным на фиг. 24 и фиг. 28, и нумерацией Chothia на основании номера аминокислотного остатка.

aMD4 является сходным с aMD4 из примера 3.

aMD5 представляет собой циклический пептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 52) из D-Tyr Trp Tyr Tyr Ala Trp Asp Gln Thr Tyr Lys Ala Phe Pro Cys, в котором хлорацетилованный D-Tyr и Cys формируют циклическую структуру. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 53) aMD5, вставленная в каждый участок области Fab, представляет собой: Tyr Trp Tyr Tyr Ala Trp Asp Gln Thr Tyr Lys Ala Phe Pro. аминокислотная последовательность, вставленная таким образом, имеет, на своем N-конце и C-конце, Gly, служащий линкером.

На фиг. 33 показаны результаты, полученные способом, сходным со способом из примера 1, для проведения совместной экспрессии с использованием клеток Expi293F (продукта Thermo Fisher Scientific), связывания культурального супернатанта на сефарозе Ni-NTA, и проведения электрофореза после промывки и элюции.

[0049] 2. Связывание слитого с пептидом белка с молекулой-мишенью

Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет слитый с пептидом белок сохранял способность связывания с рецептором Met человека (Met), которую пептид aMD4 или MD5 имел до слияния. Образец получали следующим образом: 1,0 мл культурального супернатанта, содержащего Met-PA, фрагмент растворимого рецептора, временно экспрессированный в клетках Expi293F, связывали с бусинами с антителом против метки PA (продуктом Wako Pure Chemical Industries). После осаждения сефарозы посредством разделения центрифугированием для удаления супернатанта и промывки один раз с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавляли 0,8 мл супернатанта, содержащего слитый с пептидом Fab, полученный выше, и их подвергали реакции посредством перемешивания в течение одного часа посредством вращения. Сефарозу снова осаждали посредством разделения центрифугированием и промывали два раза с использованием 1 мл TBS. Затем, добавляли 12,5 мкл TBS и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS для элюции, и продукт элюции нагревали при 95°C в течение 2 минут. Образец (12 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невосстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 34.

[0050] 3. Связывание слитого с пептидом белка с молекулой-мишенью на поверхности клеток

Тест связывания посредством проточной цитометрии проводили для исследования, действительно или нет слитые с пептидом aMD4 белки типа ОКТ3_Fab, имеющие, вставленные в их различных положениях, пептид aMD4, сохраняли способность связывания с рецептором Met человека (Met). Соответствующие супернатанты ОКТ3_Fab и шести видов слитых с пептидом aMD4 белков типа ОКТ3_Fab подвергали реакции с экспрессирующими CD3 клетками Jurkat, происходящими из пораженных лейкозом Т-лимфоцитов человека или со стабильно экспрессирующими рецептор Met человека клетками CHO, и связанные таким образом Fab окрашивали с использованием меченного AlexaFluor488 вторичного антитела против IgG человека (продукта Thermo Fisher Scientific) и анализировали с использованием проточного цитометра EC800 (продукта SONY). Результаты показаны на фиг. 35.

В верхнем столбце, подтверждали, связывается или нет просто Fab (ОКТ3-Fab) и слитый с пептидом aMD4 белок типа ОКТ3_Fab, с клетками Jurkat, экспрессирующими CD3 на клеточной поверхности. Связывание можно подтвердить по сдвигу светло-синей области к правой стороне, по сравнению с серой областью без Fab. Это позволяет предполагать, что даже слитый с пептидом aMD4 белок типа ОКТ3_Fab не теряет

присущей ему способности связывания с антигеном CD3. В нижнем столбце, исследовали способность связывания с Met, добавленную посредством вставки пептида aMD4. Можно наблюдать сдвиг для слитого с пептидом aMD4 белка типа ОКТ3_Fab, так что можно подтвердить связывание с Met-СНО (с экспрессией Met на поверхности клеток). С другой стороны, невозможно наблюдать сдвига для просто Fab (ОТК3-Fab). По такому обнаружению можно подтвердить, что слитый с пептидом aMD4 белок типа ОКТ3_Fab имеет новую специфическую для Met способность связывания, благодаря слитому с ним пептидом aMD4.

[0051] [Пример 5]

Настоящий пример осуществляли как пример 4, за исключением того, что в качестве белка Fab, Fab антитела против CD3 (антитела UCНТ1) использовали вместо антитела N1. Результаты показаны на фиг. 36 - фиг. 38.

Подтвердили, что слитый с пептидом aMD4 белок типа UCНТ1_Fab также имеет новую специфическую для Met способность связывания, благодаря слитому с ним пептиду aMD4.

[0052] [Пример 6]

1. Получение слитого с пептидом белка

Настоящий пример осуществляли, как пример 4, за исключением того, что, в качестве белка Fab, Fab антитела против CD16 (антитела 3G8) использовали вместо антитела N1. Результаты показаны на фиг. 39.

[0053] 2. Связывание слитого с пептидом белка с молекулой-мишенью

Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет полученный слитый с пептидом белок сохранял способность связывания с CD16, которую антитело 3G8 имело до слияния. Образец получали следующим образом: 0,5 мл культурального супернатанта, содержащего CD16-РА, фрагмент растворимого рецептора, временно экспрессированный в клетках Expi293F, связывали с бусинами с антителом против метки РА (продуктом Wako Pure Chemical Industries). Посредством разделения центрифугированием, сефарозу осаждали для удаления супернатанта. После промывки сефарозы один раз с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH7,5), добавляли 0,25 мл культурального супернатанта, содержащего слитый с пептидом Fab, полученный выше, и их подвергали реакции с использованием перемешивания в течение одного часа посредством вращения. Сефарозу снова осаждали посредством разделения центрифугированием и промывали два раза с использованием 1 мл TBS. Затем, 12,5 мкл TBS и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS добавляли для элюции, и продукт нагревали при 95°C в течение 2 минут. Образец (20 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невозстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 40.

[0054] Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет слитый с пептидом белок сохранял способность связывания с

рецептором Met человека (Met), которую пептид aMD4 или MD5 имел до слияния. Образец получали следующим образом: 0,5 мл культурального супернатанта, содержащего Met-РА, фрагмент растворимого рецептора, временно экспрессированный в клетках Expi293F, связывали с бусинами с антителом против метки РА (продуктом Wako Pure Chemical Industries). Посредством разделения центрифугированием, сефарозу осаждали для удаления супернатанта. После промывки сефарозы один раз с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавляли 0,25 мл культурального супернатанта, содержащего слитый с пептидом Fab, полученный выше, и их подвергали реакции посредством перемешивания в течение одного часа посредством вращения. Сефарозу снова осаждали посредством разделения центрифугированием и промывали два раза с использованием 1 мл TBS. Затем, 12,5 мкл TBS и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS добавляли для элюции, и продукт элюции нагревали при 95°C в течение 2 минут. Образец (20 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невозстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 41.

[0055] [Пример 7]

1. Получение слитого с пептидом белка (триспецифического)

Вектор для слияния цепи Н антитела-пептида mP6-9 получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для области Fab цепи Н антитела, описанного в примере 1, участка изгиба (E) его области Fab или, в качестве области петли, участка B1, B2_2 или M4 и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности mP6-9.

Вектор для слияния цепи L антитела-пептида mP6-9 получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для цепи Lк антитела, описанного в примере 1, участка изгиба (E) его области Fab или, в качестве области петли, участка B1, M1 или M2-2, и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности mP6-9.

Вектор для слияния цепи Н антитела-пептида aMD4 получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для области Fab цепи Н антитела, описанного в примере 1, участка изгиба (E) его области Fab, или в качестве области петли, участка B1, B2, M4 или M5, и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности aMD4.

Вектор для слияния цепи L антитела-пептида aMD4 получали посредством выбора, на основе экспрессирующего вектора для цепи Lк антитела, описанного в примере 1, участка изгиба (E) его области Fab или в качестве области петли, участка B2-2, M2 или M2-2, и вставки в них последовательности ДНК, соответствующей последовательности aMD4.

Участок вставки биоактивного пептида в цепи Н или цепи L представляет собой участок вставки, показанный на фиг. 6 или фиг. 13.

Триспецифический слитый с пептидом белок типа Fab получали посредством

совместной экспрессии вектора для слияния цепи Н антитела-пептида mP6-9 и вектора для слияния цепи L антитела-пептида aMD4, или вектора для слияния цепи Н антитела-пептида aMD4 и вектора для слияния цепи L антитела-пептида mP6-9 в клетках Expi293F (продукта Thermo Fisher Scientific) и таким образом, секретируют их в культуральный супернатант. Культивирование или трансфекцию клеток проводили, следуя стандартному способу Thermo Fisher Scientific.

Образец получали посредством добавления 40 мкл сефарозы Ni-NTA (продукта Qiagen) к 0,25 мл собранного культурального супернатанта, перемешивания полученной смеси посредством вращения в течение 1 час, осаждения сефарозы посредством разделения центрифугированием для удаления супернатанта, промывки сефарозы два раза с использованием 1 мл забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавления 12,5 мкл 500 mM имидазола, имеющего pH 8,0, к TBS для элюции, добавления 12,5 мкл буфера для образцов с SDS; и нагревания полученной смеси при 95°C в течение 2 минут. Образец (5 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невосстанавливающих условиях и окрашивали с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты показаны на фиг. 42.

[0056] 2. Связывание слитого с пептидом белка (триспецифического) с молекулой-мишенью

Тест связывания типа осаждения проводили для исследования, действительно или нет триспецифический слитый пептид типа белка Fab сохранял каждую из способности связывания с нейропилином 1, способности связывания с плексином В1 человека, которую пептид mP6-9 имел до слияния, и способность связывания с рецептором Met человека (Met), которую пептид aMD4 имел до слияния. В соответствии со способом, описанным в Protein Exp. Purification, 2014; 95: 240-247, конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку PA (продукт Wako Pure Chemical Industries), добавленную к С-концу внеклеточной области плексина В1 человека, конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку PA (продукт Wako Pure Chemical Industries), добавленную к С-концу внеклеточной области рецептора Met человека, и конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку PA, добавленную к С-концу внеклеточной области нейропиллина 1 мыши, получали, и каждую из них вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific). Полученные векторы временно экспрессировали в клетках Expi293F посредством вышеописанного способа, и получали соответствующие культуральные супернатанты, содержащие плексин В1-РА, Met-РА и нейропилин 1-РА, каждый фрагмент растворимого рецептора.

Образец получали, как описано ниже: 1,0 мл культурального супернатанта, полученного посредством временной экспрессии в клетках Expi293F и содержащего любой из плексина В1-РА, Met-РА, и нейропиллина 1-РА, каждый фрагмент растворимого рецептора, связывали с бусинами с антителом против метки PA (продукт Wako Pure Chemical Industries). Сефарозу осаждали посредством разделения центрифугированием, и супернатант удаляли. После промывки сефарозы один раз с использованием 1 мл

забуференного Трис солевого раствора (TBS, 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавляли 1,0 мл культурального супернатанта, содержащего слитый с пептидом Fab, полученный выше, и их подвергали реакции посредством перемешивания в течение одного часа посредством вращения. Разделение посредством центрифугирования проводили снова для осаждения сефарозы. Сефарозу промывали дважды с использованием 1 мл TBS и затем, 12,5 мкл TBS и 12,5 мкл буфера для образцов с SDS добавляли для элюции, с последующим нагреванием при 95°C в течение 2 минут. Образец (5 мкл), полученный таким образом посредством элюции, подвергали электрофорезу в невозстанавливающих условиях, с последующим окрашиванием с использованием кумасси бриллиантового синего. Результаты для нейропилена 1-РА показаны на фиг. 43, результаты для плексина В1-РА показаны на фиг. 44, и результаты для Met-РА показаны на фиг. 45N.

Подтвердили по результатам на фиг. 43 - фиг. 45, что триспецифический слитый пептид типа белка Fab сохранял каждую из способности связывания с нейропилином 1, способности связывания с плексином В1 человека, которую пептид mP6-9 имел до слияния, и способности связывания с рецептором Met человека (Met), которую пептид aMD4 имел до слияния.

[0057] 3. Одновременная способность связывания слитого с пептидом белка с двумя видами молекул-мишеней

3-1. Принцип теста межмолекулярного перекрестного связывания типа сэндвича и получение антигена-мишени

Систему анализа типа сэндвич-ELISA конструировали, чтобы показать, что слитый триспецифический пептид типа Fab может одновременно связываться с двумя видами молекул-мишеней. Принцип показан на фиг. 46A. Сначала, в соответствии со способом, описанным в Protein Exp. Purification, 2014, 95, 240-247, получали конструкцию, кодирующую слитый белок, имеющий метку РА (продукт Wako Pure Chemical Industries), добавленную к С-концу внеклеточной области плексина В1 человека или рецептора Met человека, служащего второй молекулой-мишенью, и полученную конструкцию вставляли в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (продукт Thermo Fisher Scientific). Полученный вектор временно экспрессировали в клетках Expi293F способом, сходным со способом из примера 1, для получения культурального супернатанта, содержащего плексин В1-ВА или Met-РА, фрагмент растворимого рецептора, с последующей очисткой с использованием бусин с антителом против метки РА (продукта Wako Pure Chemical Industries). Со стороны первого антигена, pAPtag-5 (продукт GenHunter), экспрессирующий вектор для слияния с AP, использовали для слияния последовательности его внеклеточной области с N-концевым (от нейропилена 1) AP. Посредством временной экспрессии в клетках Expi293F способом, сходным со способом из примера 1, получали культуральные супернатанты, каждый из которых содержал Ngr1ec-AP, продукт слияния растворимого рецептора-AP.

[0058] 3-2. Тест межмолекулярного перекрестного связывания типа сэндвича

Перекрестное связывание между двумя молекулами-мишенями посредством

слитого триспецифического пептида типа Fab (триспецифического Fabbody) оценивали в соответствии со следующим способом, основанном на принципе, показанном на фиг. 20А.

(1) 50 мкл очищенного раствора второго антигена-мишени, разведенного до 10 мкг/мл, добавляли в 96-луночный планшет, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 3 часов.

(2) После удаления очищенного раствора второго антигена-мишени, добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора Blocking One (продукта Nacalai Tesque) разведенного в 10 раз с использованием TBS (TBS; 20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), и планшету позволяли стоять в течение ночи при 4°C.

(3) Планшет промывали один раз с использованием 200 мкл/лунку TBS.

(3) Добавляли 50 мкл супернатанта после экспрессии слитого белка типа триспецифического пептида, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 2,5 часов.

(4) Планшет промывали три раза с использованием 200 мкл/лунку TBS.

(5) Добавляли 50 мкл супернатанта после экспрессии слитого с AP первого антигена-мишени, и планшету позволяли стоять при комнатной температуре в течение 2 часов.

(6) Планшет промывали четыре раза с использованием 200 мкл/лунку TBS и наконец, добавляли 100 мкл/лунку TBS.

(7) После того, как 100 мкл/лунку хромогенного субстрата (субстрата фосфатазы, продукта Sigma Aldrich) добавляли, и планшету позволяли стоять при 37°C в течение 30 минут, измеряли оптическую плотность при 405 нм раствора в каждой лунке. Результаты показаны на фиг. 46В.

Слитый триспецифический пептид типа Fab, связывался с планшетом, имеющим иммобилизованные на нем каждый из вторых антигенов-мишеней, и связывался со слитым белком первый антиген-мишень-AP, добавленным позднее, чтобы вызывать развитие окрашивания субстрата. С другой стороны, для N1_Fab, не имеющего вставленного пептида, не получали положительного сигнала. Это показывает, что Fabbody, слитый триспецифический пептид типа Fab, является способным к одновременному связыванию с плексиномом B1 и нейропилином или Met и нейропилином. Иными словами, результаты настоящего теста позволяют предполагать, что полученное таким образом Fabbody имеет триспецифичность.

[0059] Слитый с пептидом белок, полученный посредством слияния одного биоактивного пептида с областью Fab, то есть, антигенсвязывающим участком IgG, может иметь новую способность связывания, основанную на биоактивности слитого биоактивного пептида, с использованием в то же время присущего области Fab антигенсвязывающего участка.

Когда Fab использовали в качестве белка, имеющего область Fab, являющуюся антигенсвязывающим участком IgG, биспецифический Fab легко конструировали. Термин «биспецифический Fab», в рамках изобретения, обозначает вид Fabbody.

Поскольку Fab существует в форме гетеродимера, аминокислотные последовательности, происходящие из соответственно различных биоактивных пептидов, можно вставлять в цепь Н и цепь L. Это делает возможным разработку мультиспецифических Fab, таких как триспецифический Fab или тетраспецифический Fab, или Fab с более высоким количеством специфичностей. Практически, подтверждено, что, применительно к триспецифическому Fab, слитый с пептидом белок может иметь новую способность связывания, основанную на биоактивности двух видов слитых биоактивных пептидов, с использованием в то же время исходного антигенсвязывающего участка области Fab.

Является возможной также разработка мультиспецифического антитела посредством вставки аминокислотной последовательности, происходящей из биоактивного пептида, не только в IgG или Fab, но также в биспецифическое антитело, в отличный от определяющего антиген участок, как показано на фиг. 3 - фиг. 5, или в его малый фрагмент или производное.

Когда биоактивный пептид имеет агонистическую активность, это приводит к разработке Fab, имеющего агонистическую активность, происходящую из биоактивности пептида. Даже когда биоактивный пептид не имеет агонистической активности, можно получать искусственный белок, имеющий агонистическую активность, посредством его получения в форме искусственного белка по настоящему изобретению, имеющего слитый с ним биоактивный пептид.

Подтверждено, что даже в области Fv Fab, можно достигать вставки аминокислотной последовательности, происходящей из биоактивного пептида, как в цепь L, так и в цепь H, и сохранения его активности, так что биоактивный пептид можно вставлять также в фрагмент, имеющий по меньшей мере область Fv, такой как scFv, диатело или taFv.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Искусственный белок, имеющий биоактивный пептид, слитый с участком белка, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, присутствующую в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

2. Искусственный белок по п.1, сохраняющий антигенсвязывающую активность, происходящую из антитела, и наделенный функцией, происходящей из биоактивного пептида.

3. Искусственный белок по п.1 или 2, где биоактивный пептид представляет собой циклический пептид или линейный пептид.

4. Искусственный белок по любому из пп. 1-3, где белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой Fv, Fab, scFv, IgG, диатело или taFv.

5. Искусственный белок по любому из пп. 1-4, где участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, присутствует в области петли или в области изгиба в фрагменте Fab антитела.

6. Искусственный белок по любому из пп. 1-5, имеющий мультиспецифичность.

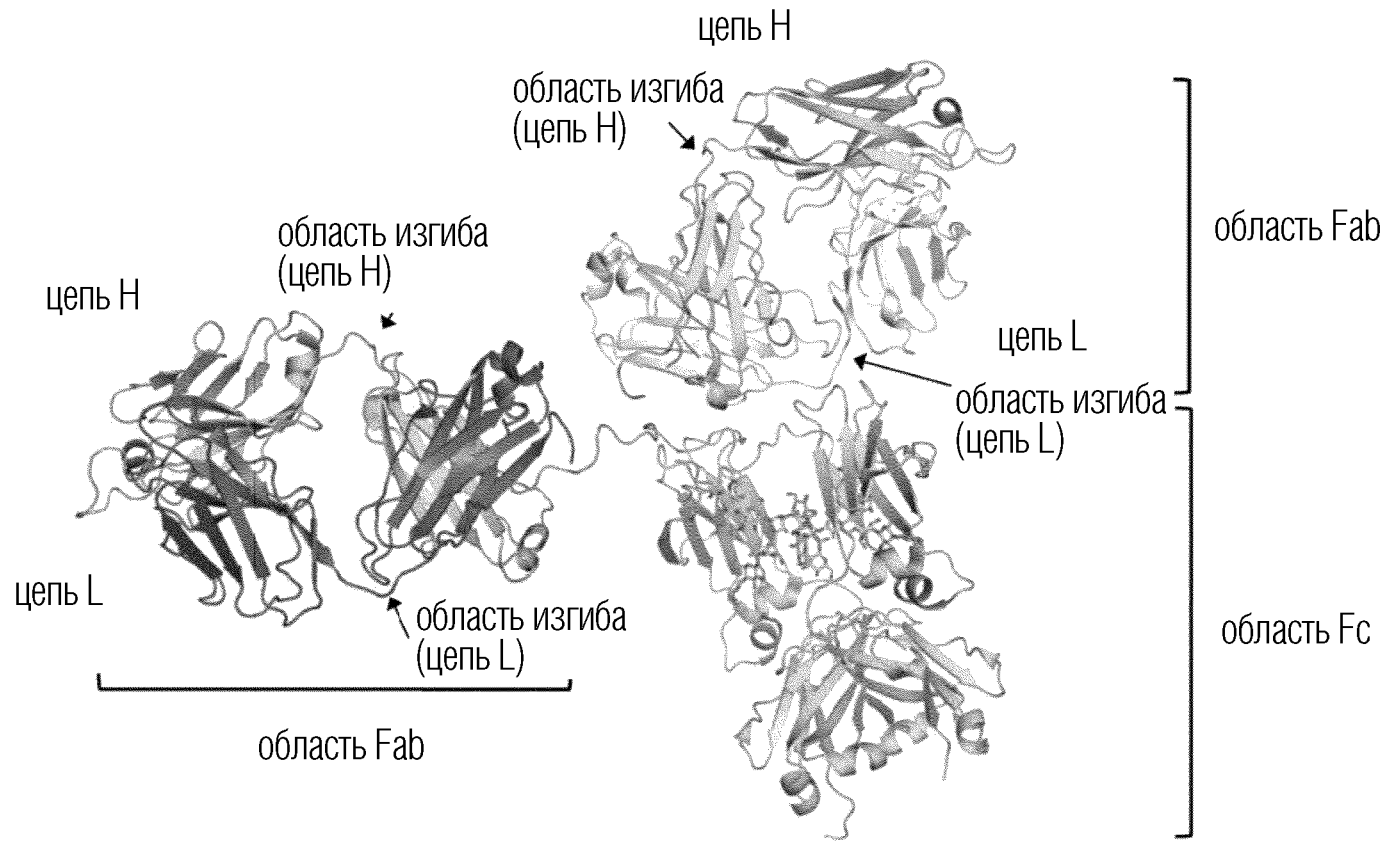
7. Способ представления биоактивного пептида на белке, имеющем по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, включающий слияние биоактивного пептида с участком белка, присутствующим в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка.

8. Способ представления биоактивного пептида на белке по п.7, включающий обеспечение сохранения белком антигенсвязывающей активности, происходящей из антитела, и придание белку функции, происходящей из биоактивного пептида.

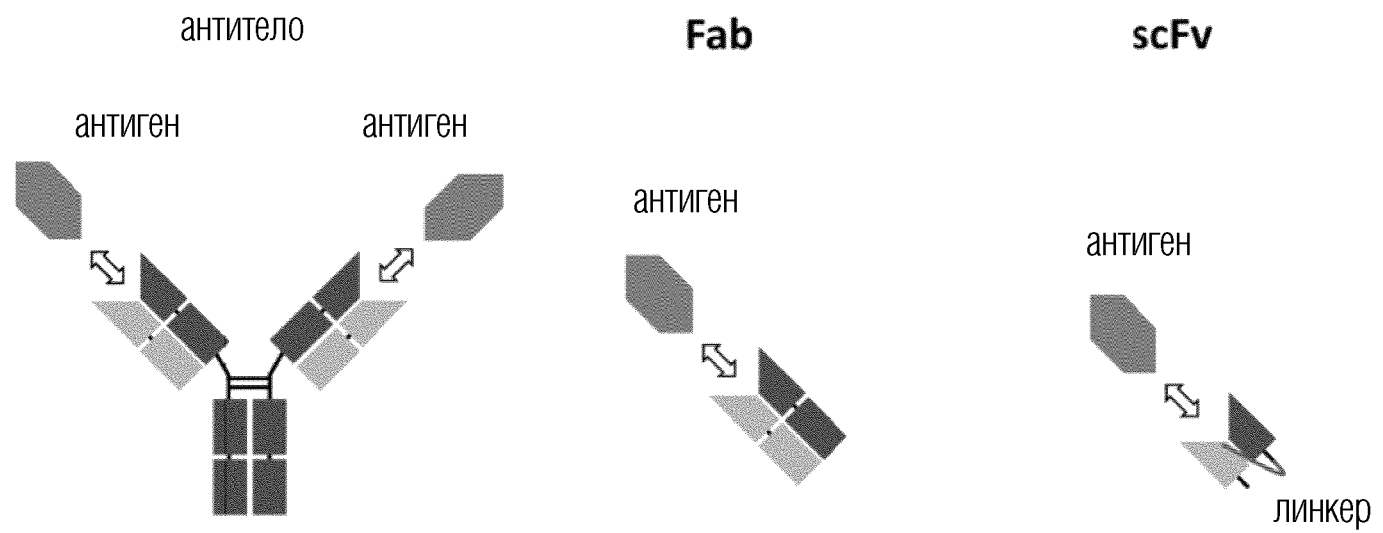
9. Способ представления биоактивного пептида на белке по п.7 или 8, где биоактивный пептид представляет собой циклический пептид или линейный пептид.

10. Способ представления биоактивного пептида на белке по любому из пп. 7-9, где белок, имеющий по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, представляет собой Fv, Fab, scFv, IgG, диатело или taFv.

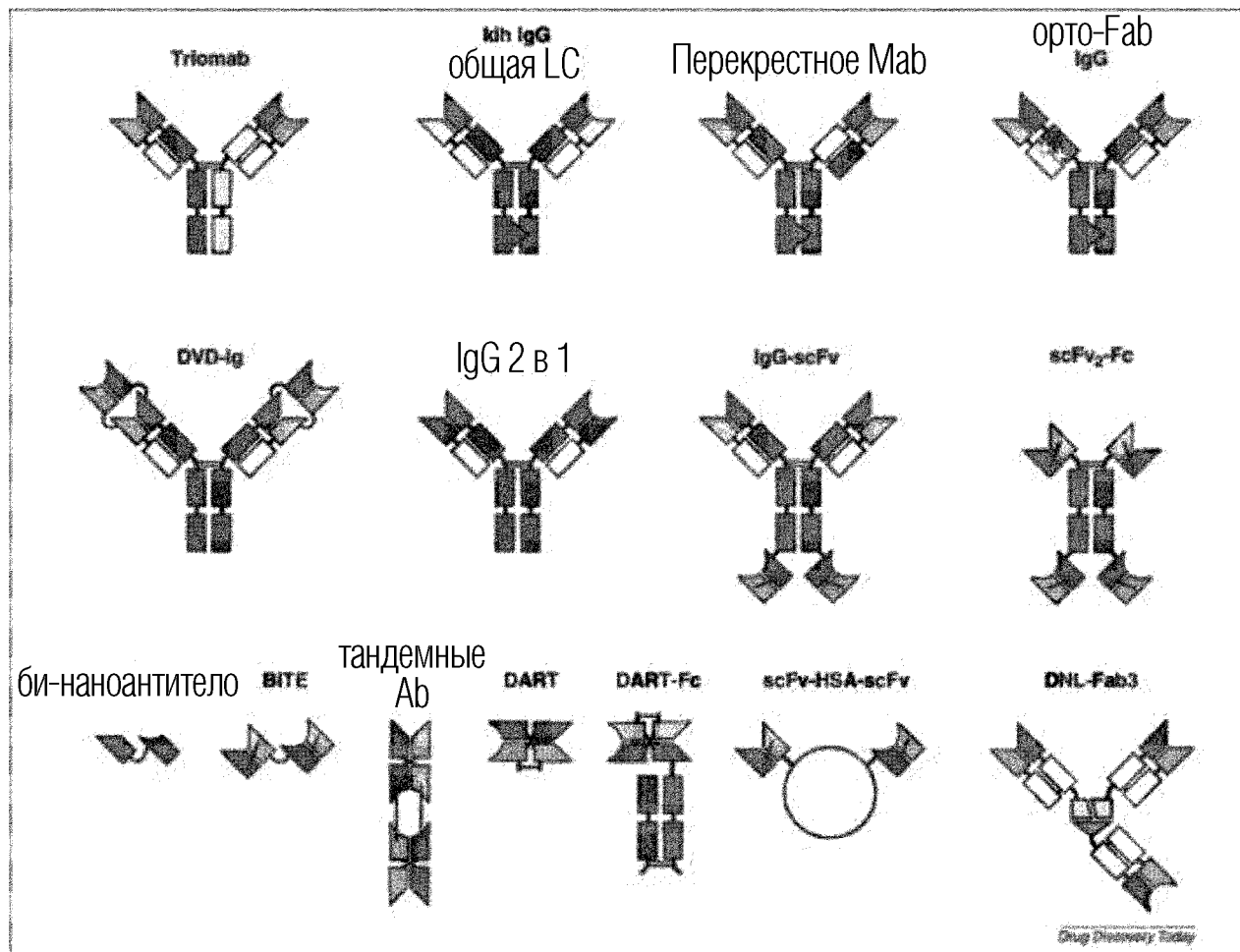
11. Способ представления биоактивного пептида на белке по любому из пп. 7-10, где участок, присутствующий в свернутой части вторичной структуры, в структурной области, имеющей антигенсвязывающую активность и экспонированной на поверхности белка, присутствует в области петли или в области изгиба в фрагменте Fab антитела.



ФИГ. 1

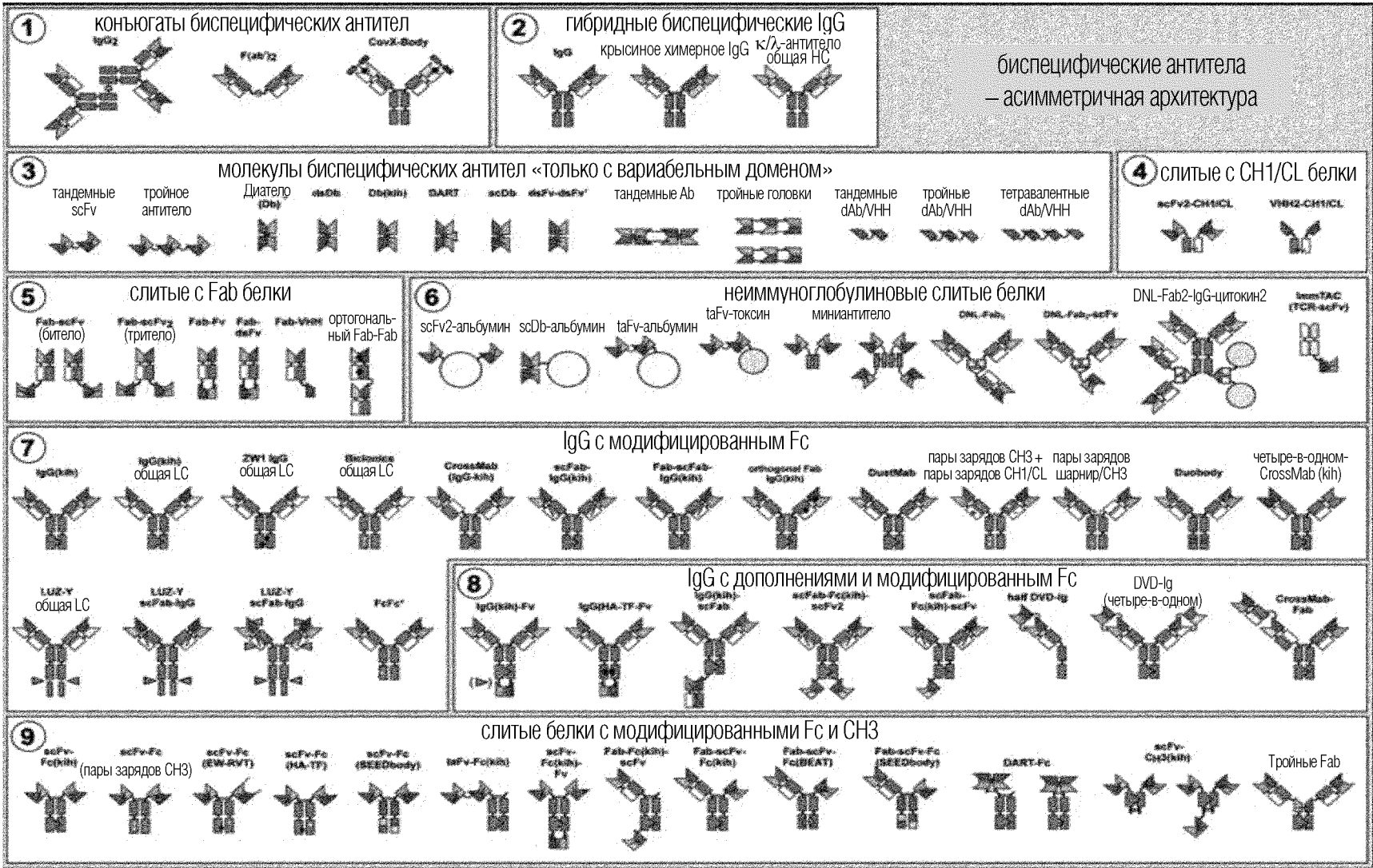


ФИГ. 2



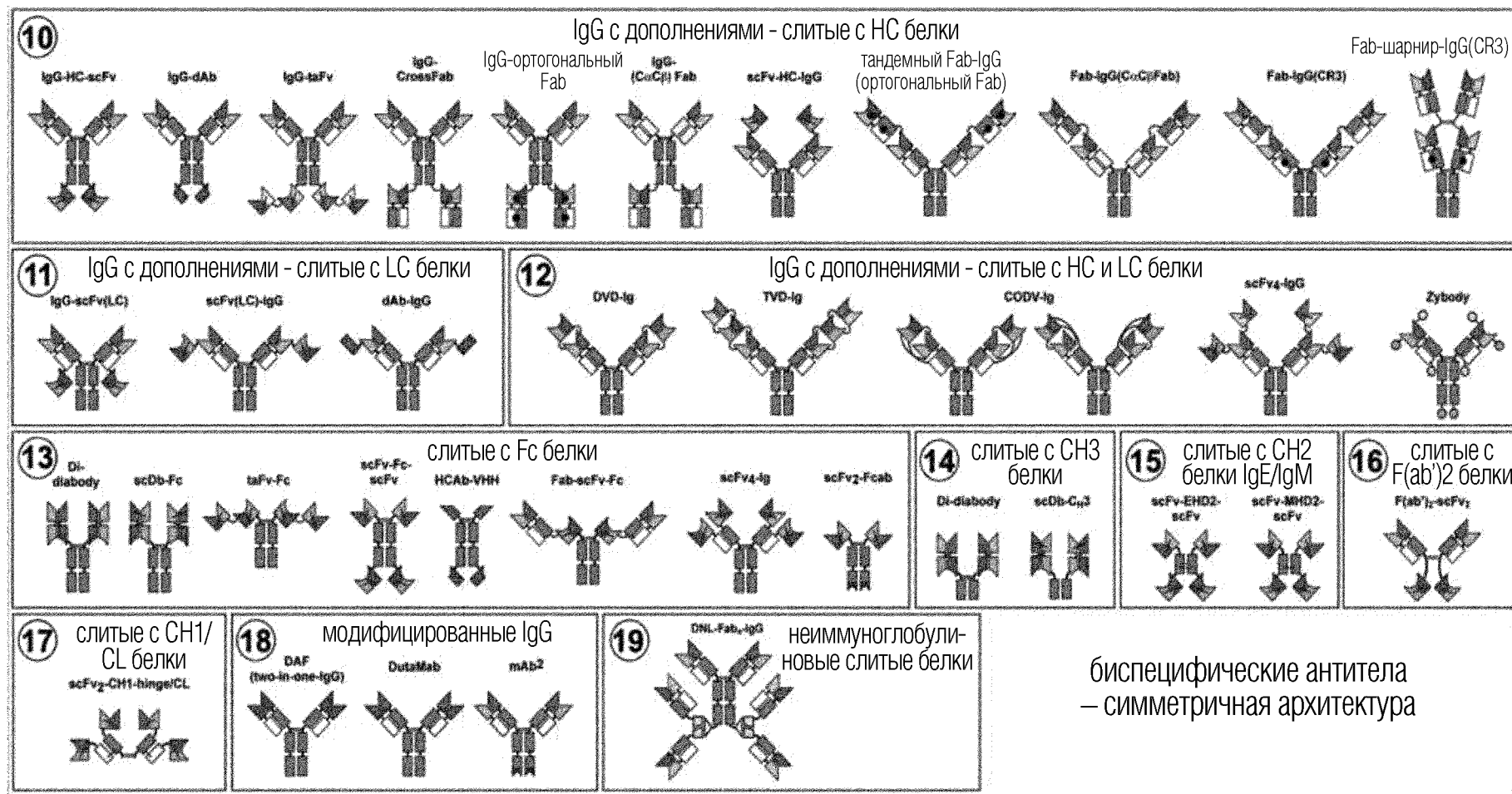
Drug Discovery Today, 20(7), 838 (2015)

ФИГ. 3

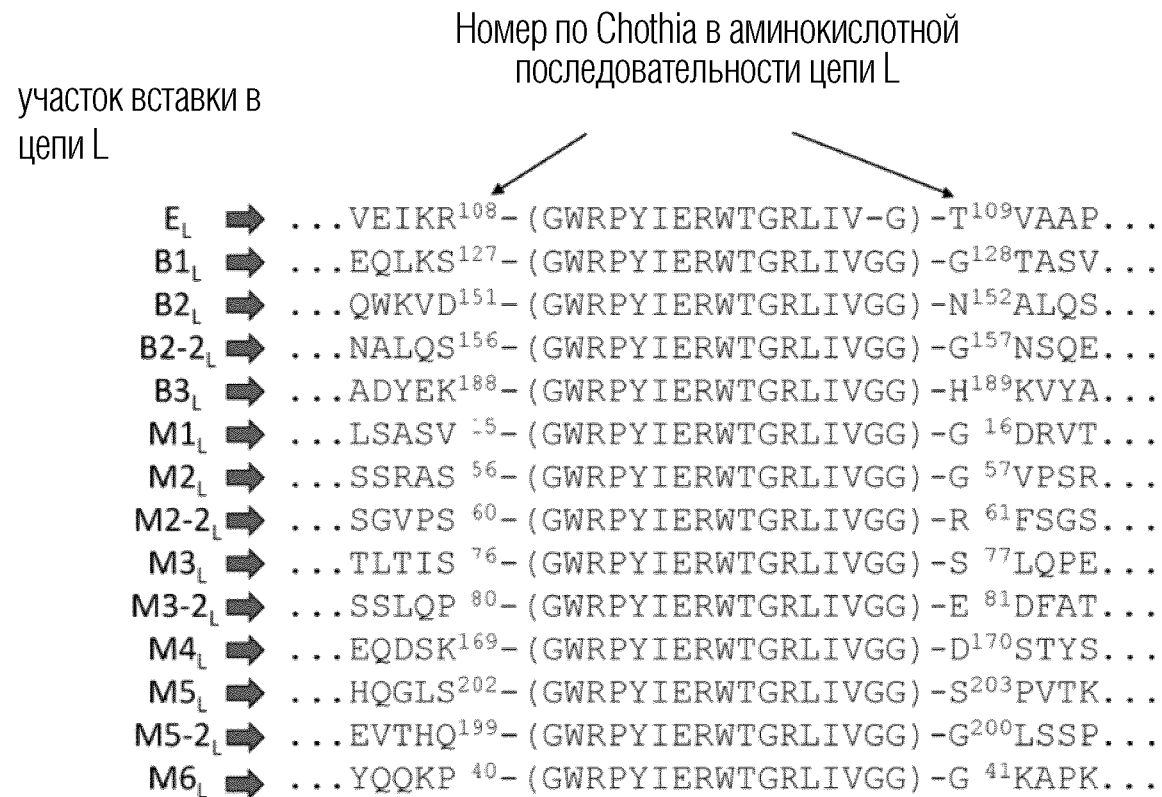


ФИГ. 4

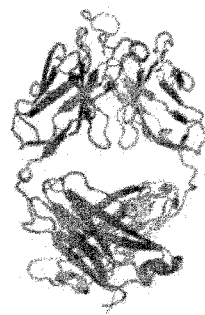
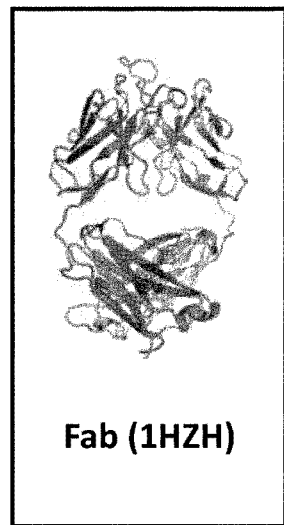
MABS, 2017, 9(2), 182–212



ФИГ. 5



ФИГ. 6



Участок изгиба_L (участок E_L)



участок B1_L



участок B2_L

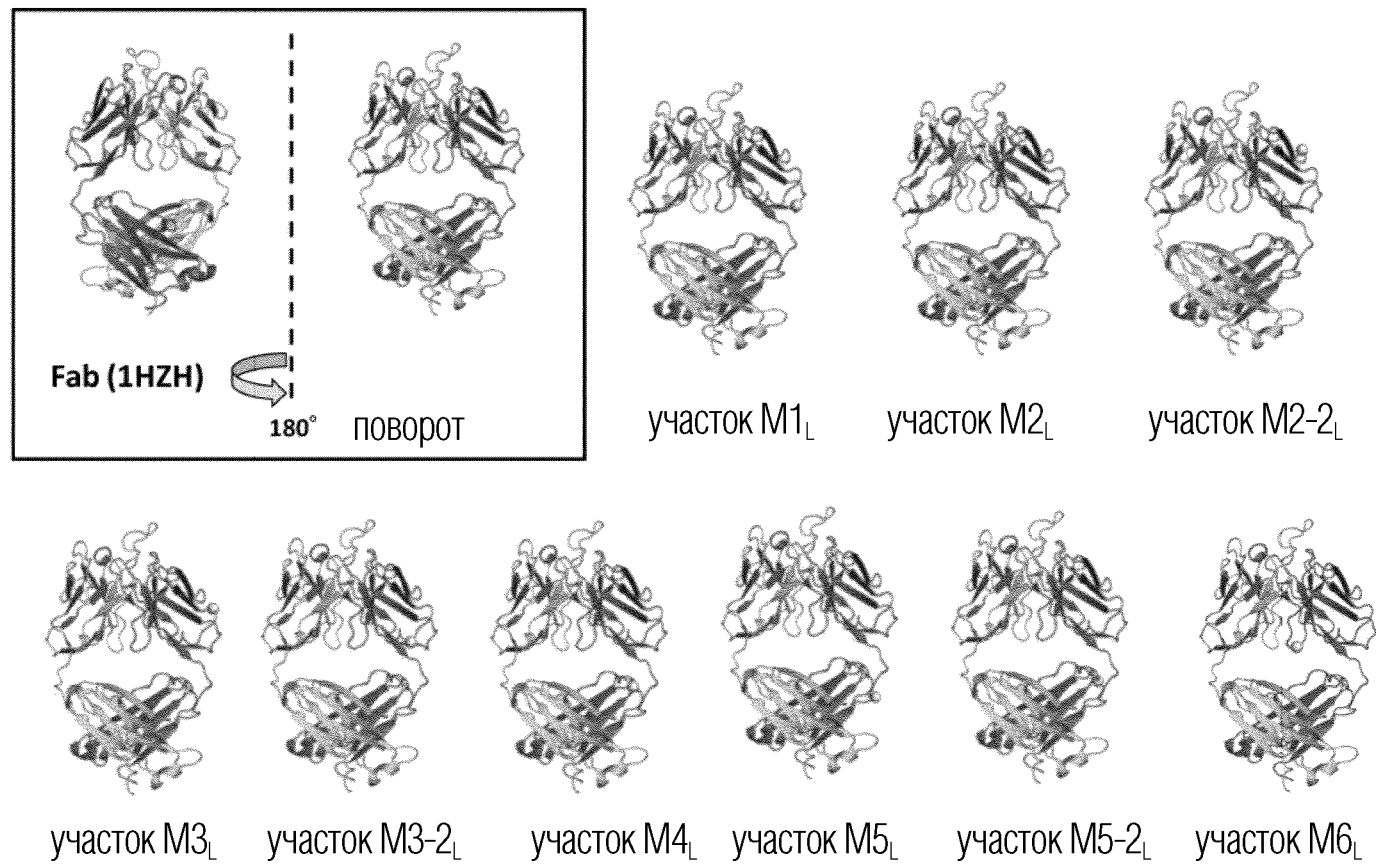


участок B2-2_L



участок B3_L

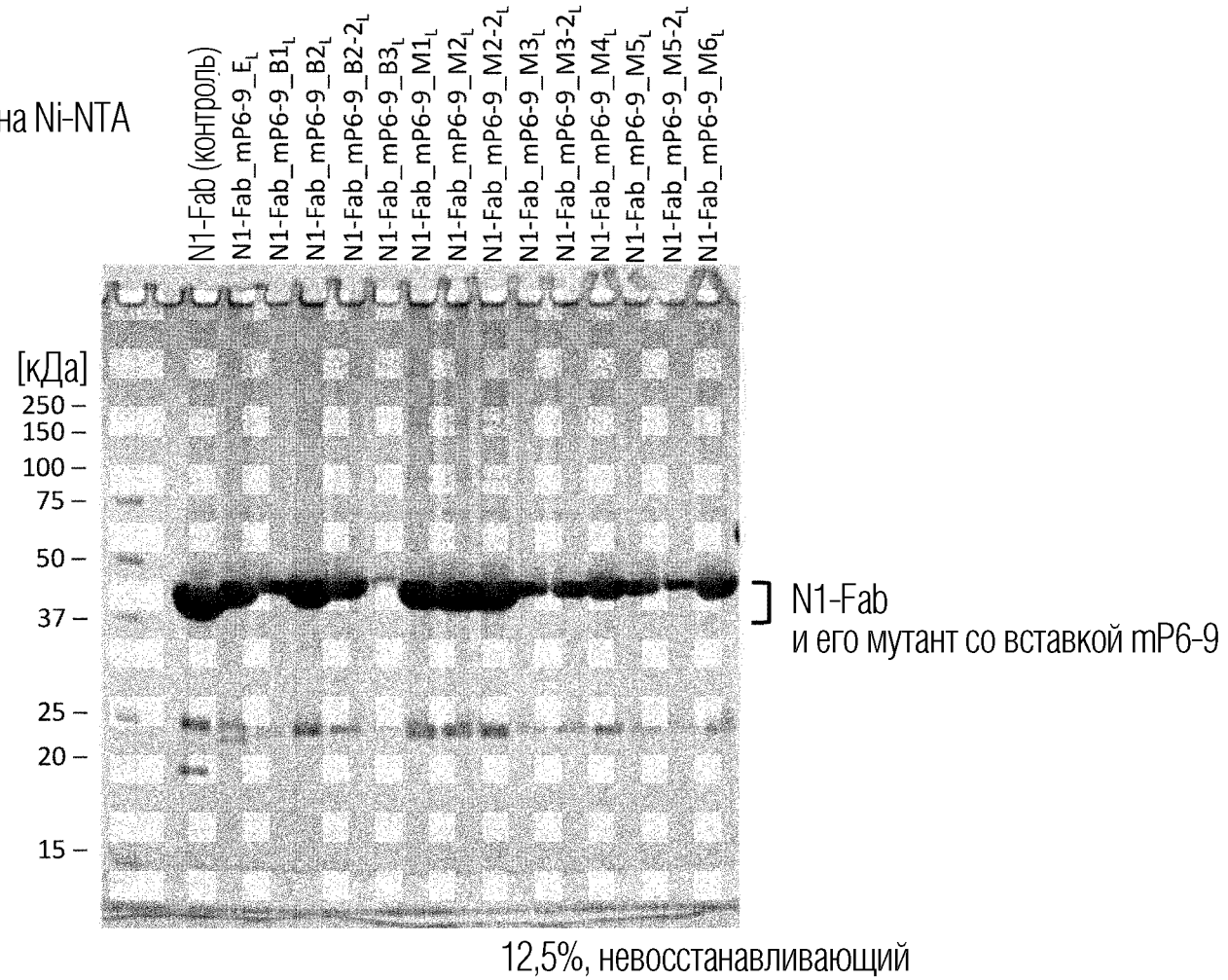
ФИГ. 7



ФИГ. 8

Проверка экспрессии N1-Fab (вставка mP6-9)

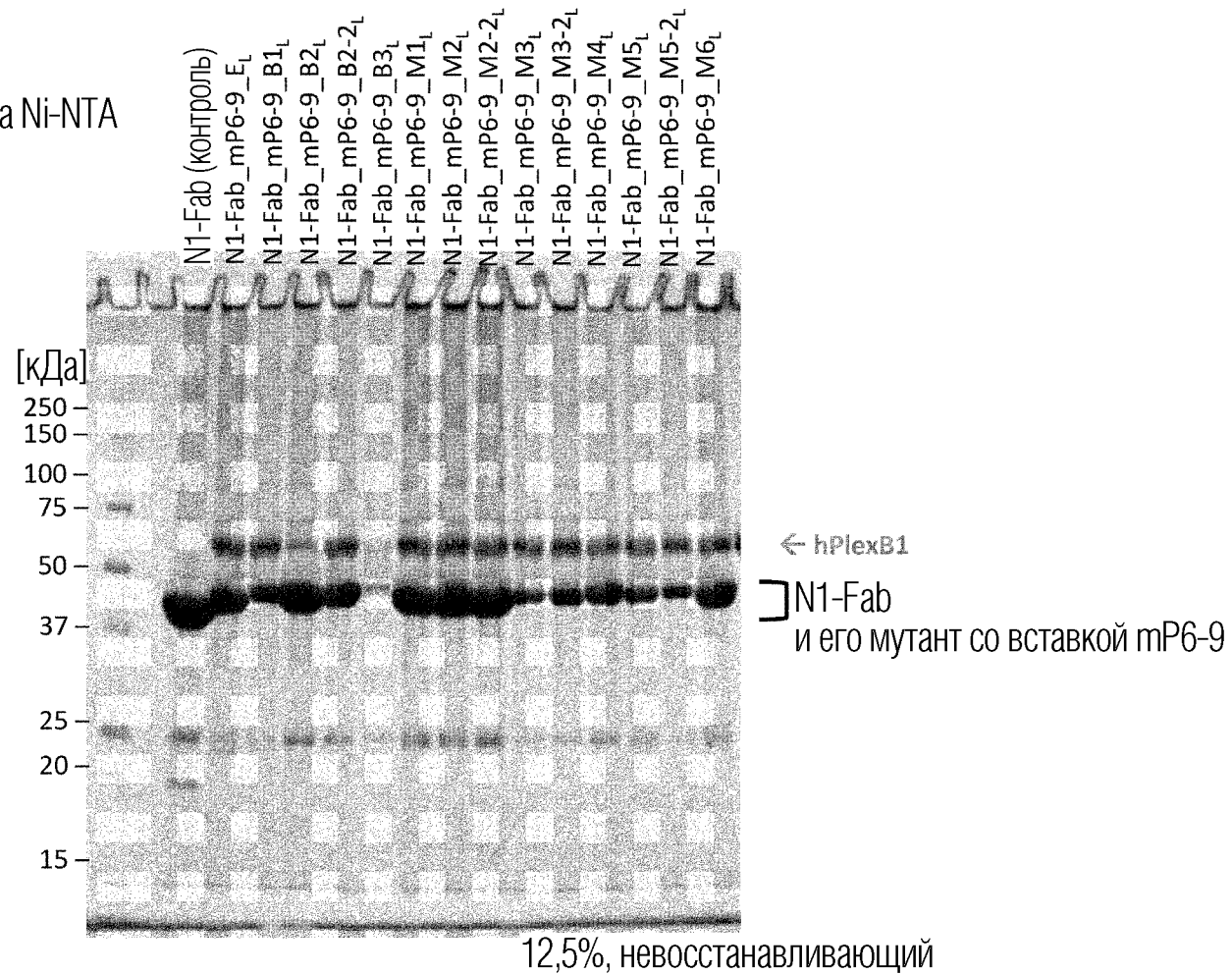
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 9

Проверка связывания с hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9)

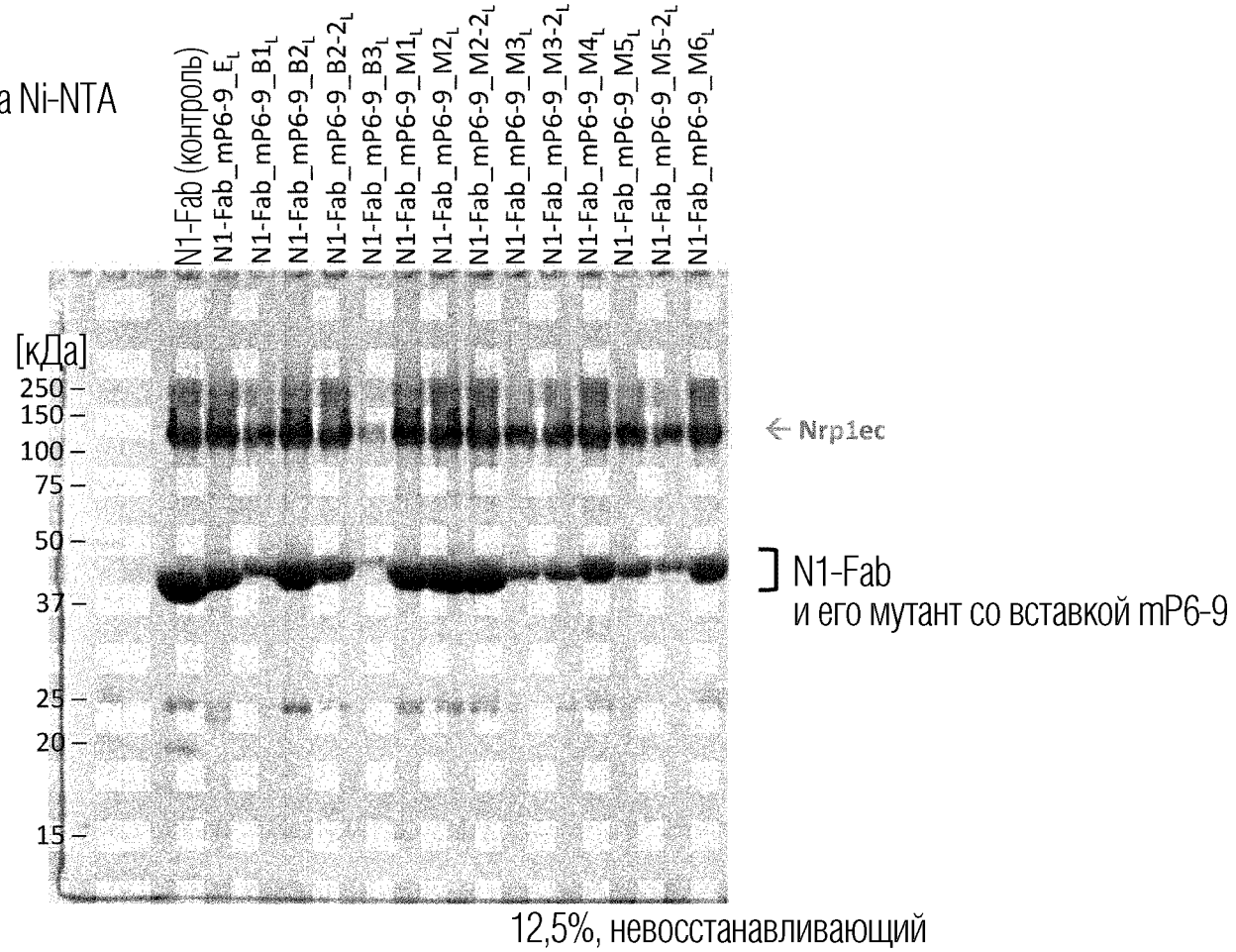
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 10

Проверка связывания с Nrp1ec N1-Fab (вставка mP6-9)

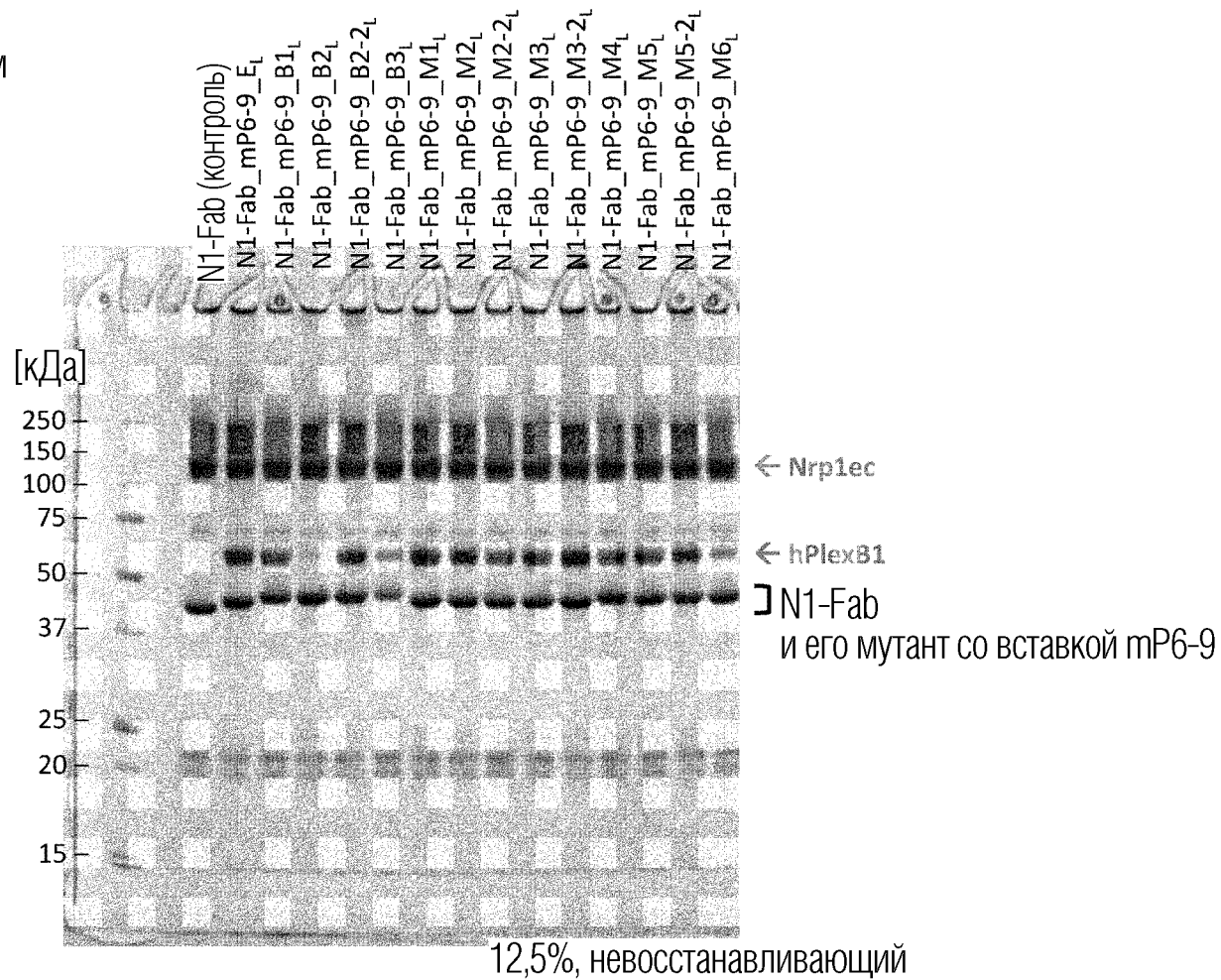
Осаждение на Ni-NTA



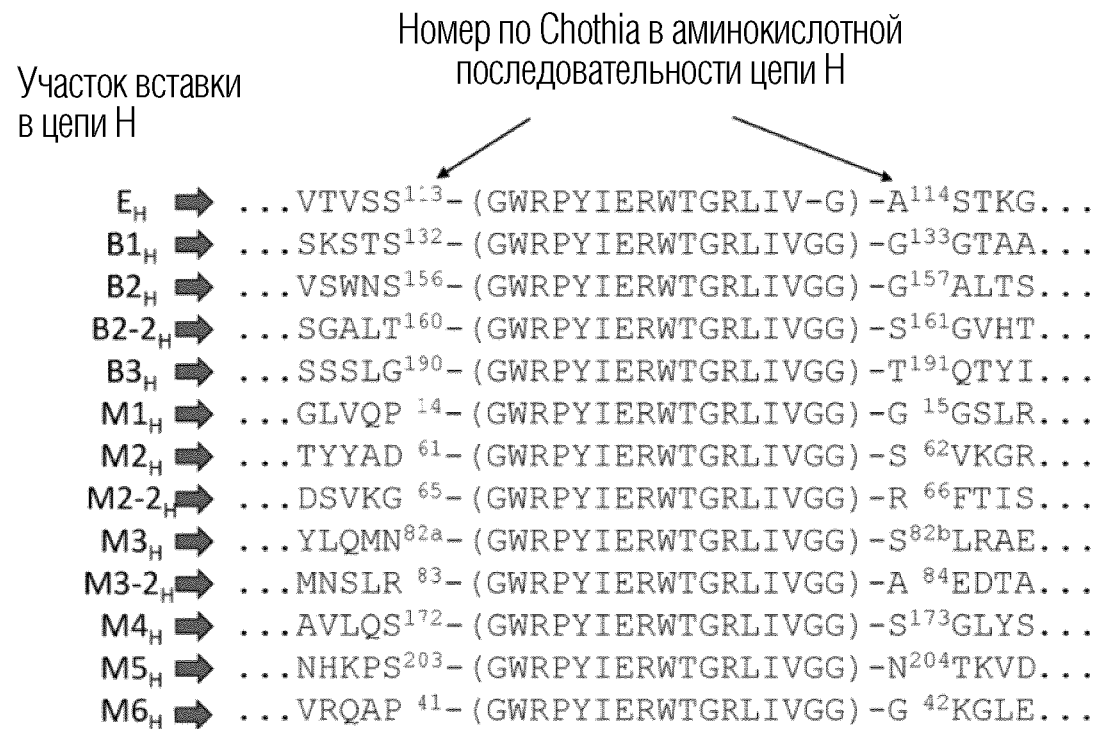
ФИГ. 11

Проверка связывания с Nrp1ec, hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9)

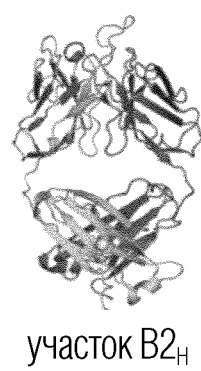
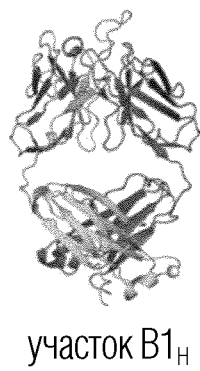
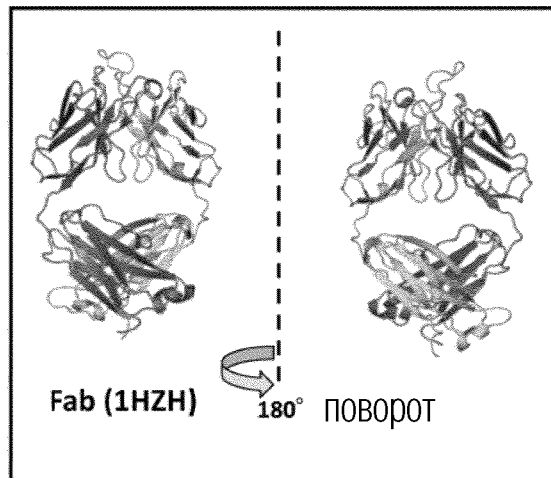
Осаждение с использованием антитела против метки FLAG



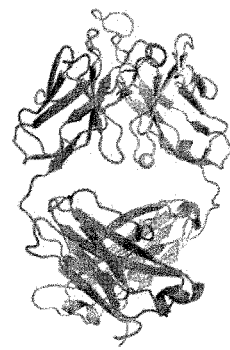
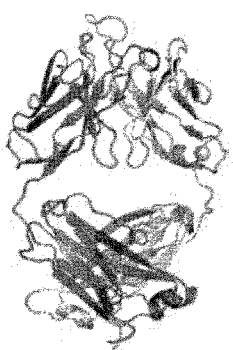
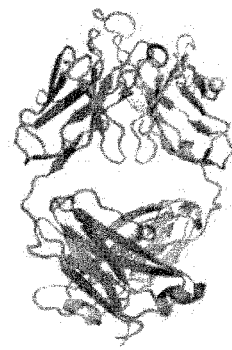
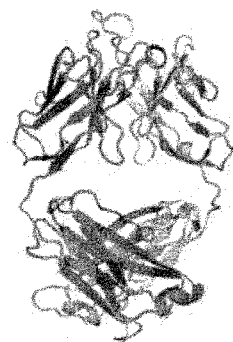
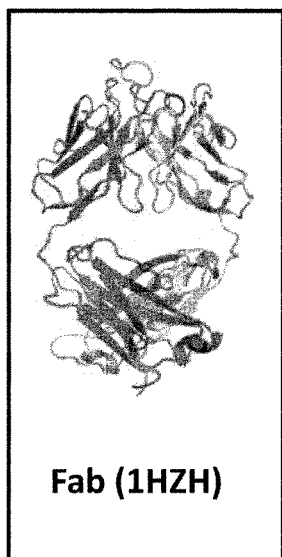
ФИГ. 12



ФИГ. 13



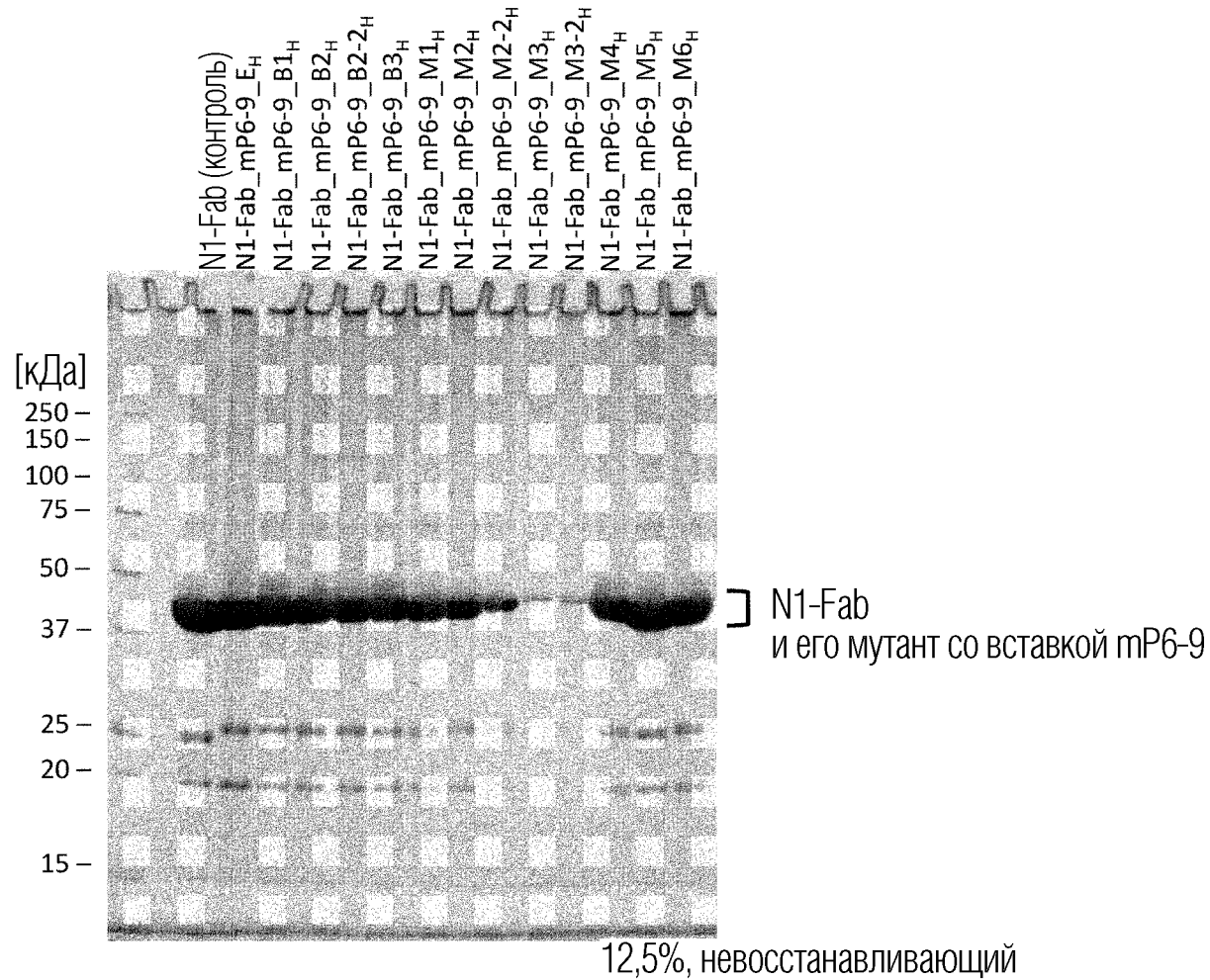
ФИГ. 14



ФИГ. 15

Проверка экспрессии N1-Fab (вставка mP6-9)

Осаждение на Ni-NTA

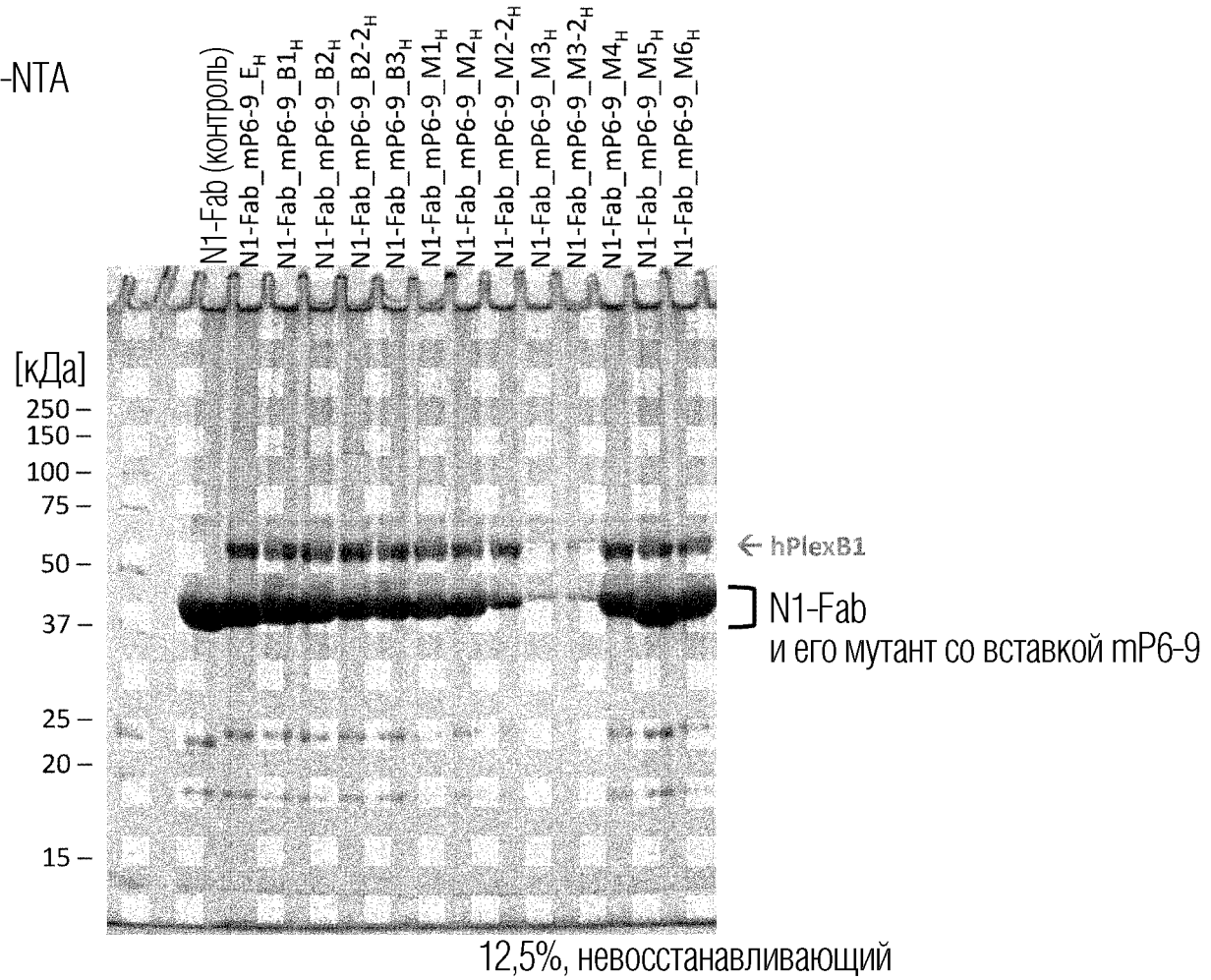


16/49

ФИГ. 16

Проверка связывания с hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9)

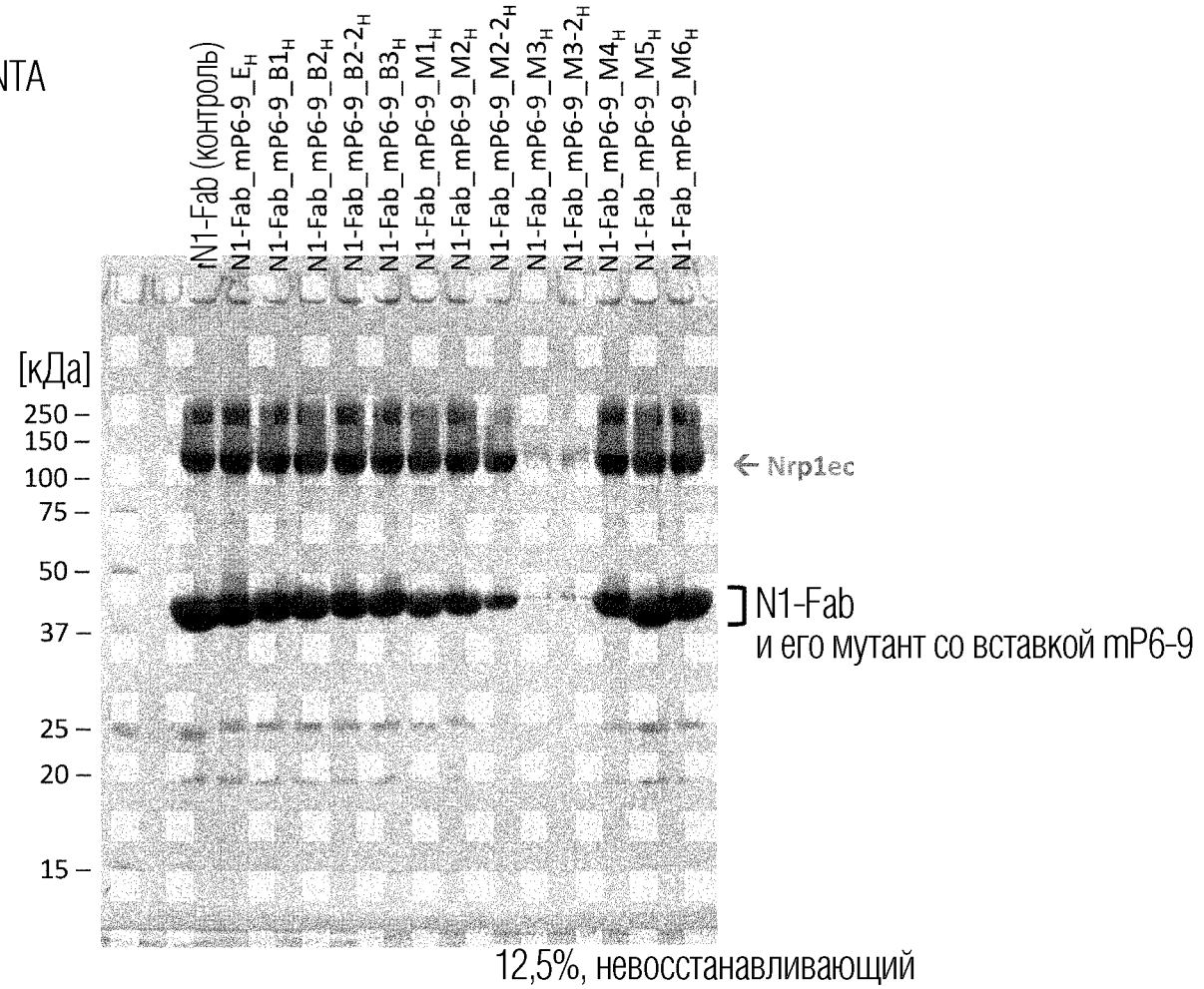
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 17

Проверка связывания с Nrp1ec N1-Fab (вставка mP6-9)

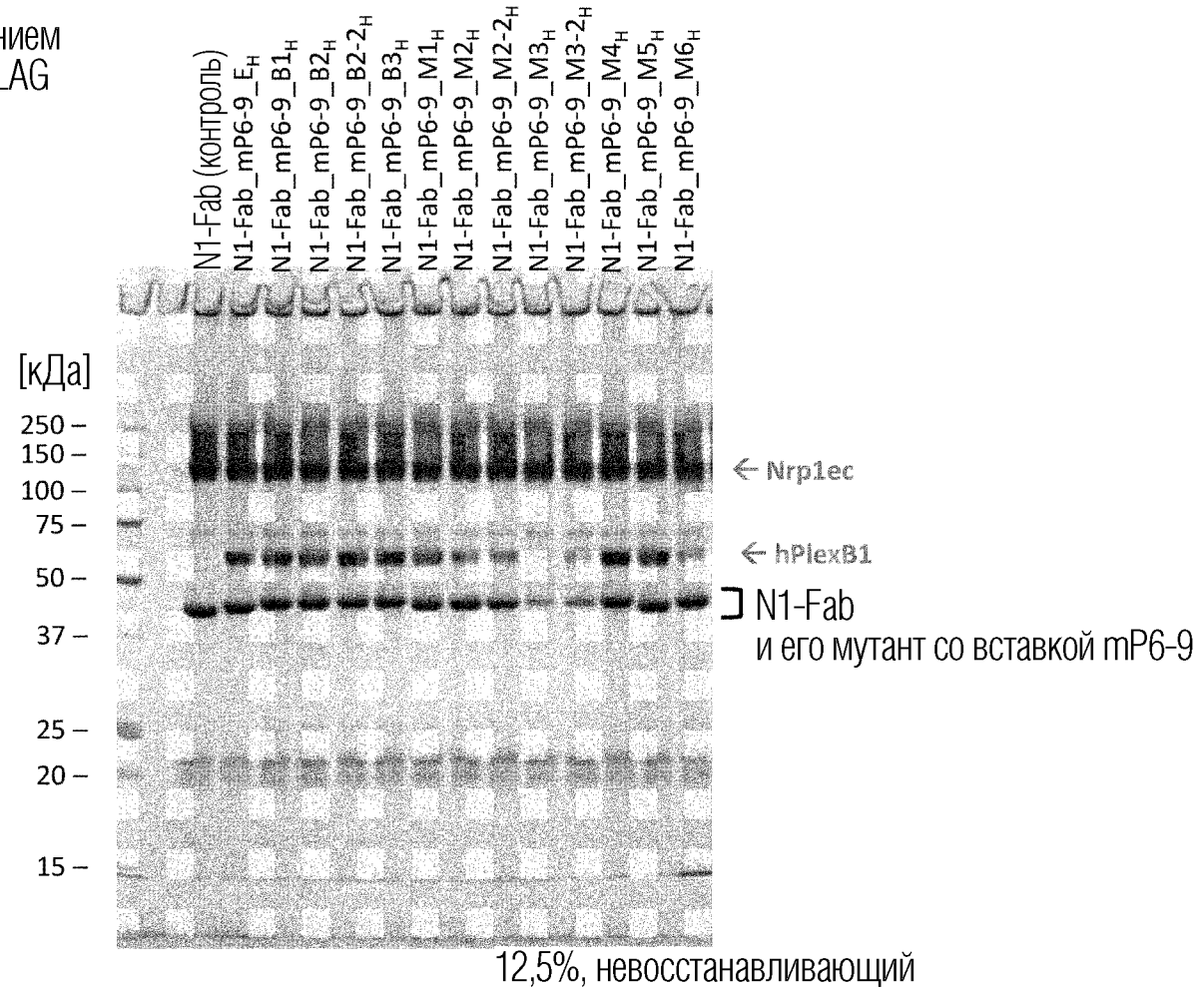
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 18

Проверка связывания с Nrp1ec, hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9) (1)

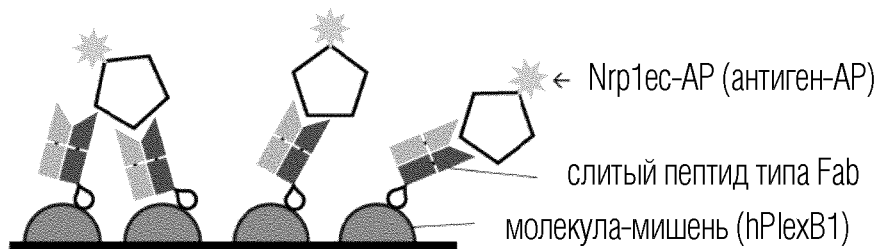
Осаждение с использованием антитела против метки FLAG



ФИГ. 19

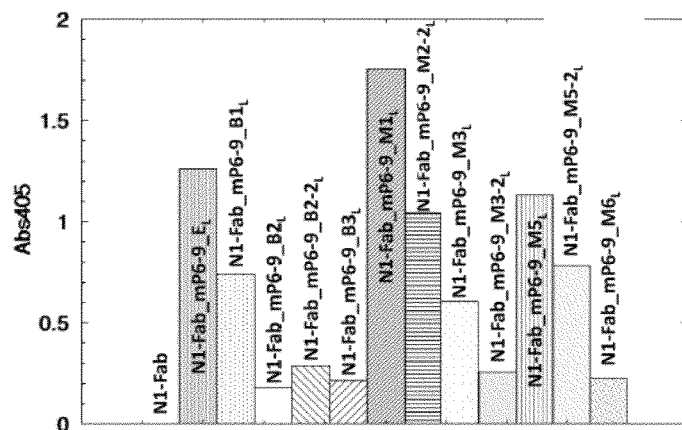
Проверка связывания с Npr1ec, hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9)

(A) Анализ AP

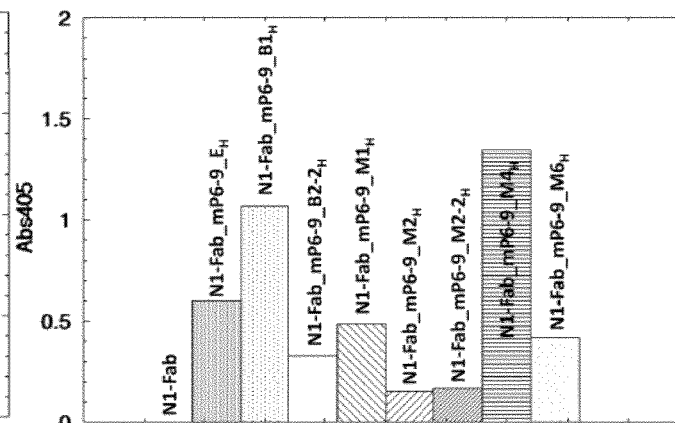


(B)

Вставка mP6-9 в цепь L



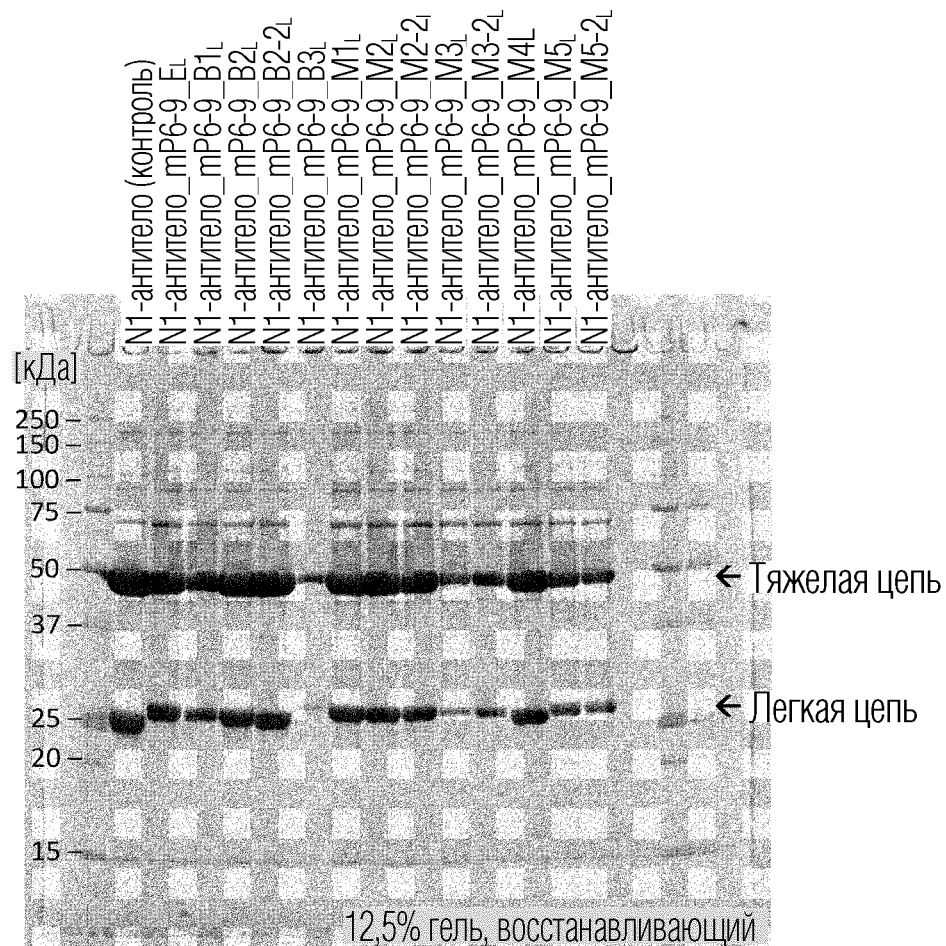
Вставка mP6-9 в цепь H



ФИГ. 20

Проверка экспрессии N1-IgG1 (вставка mP6-9)

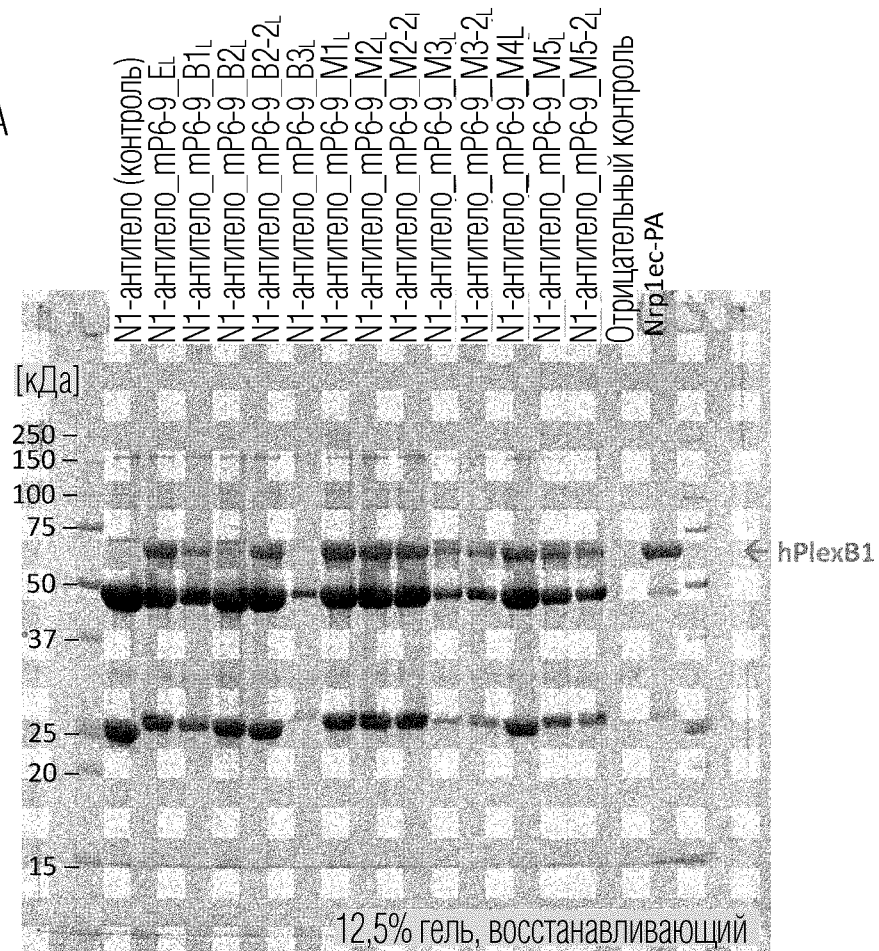
Осаждение с р-белком А



ФИГ. 21

Проверка связывания с hPlexB1 N1-IgG (вставка mP6-9)

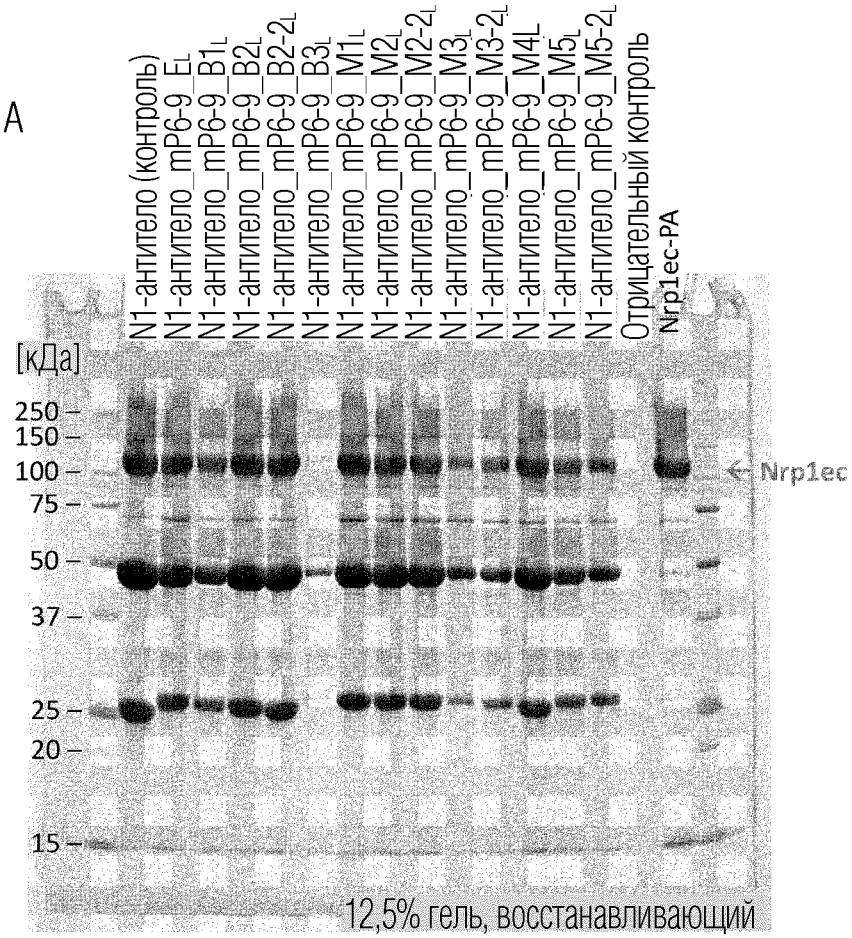
Осаждение с р-белком А



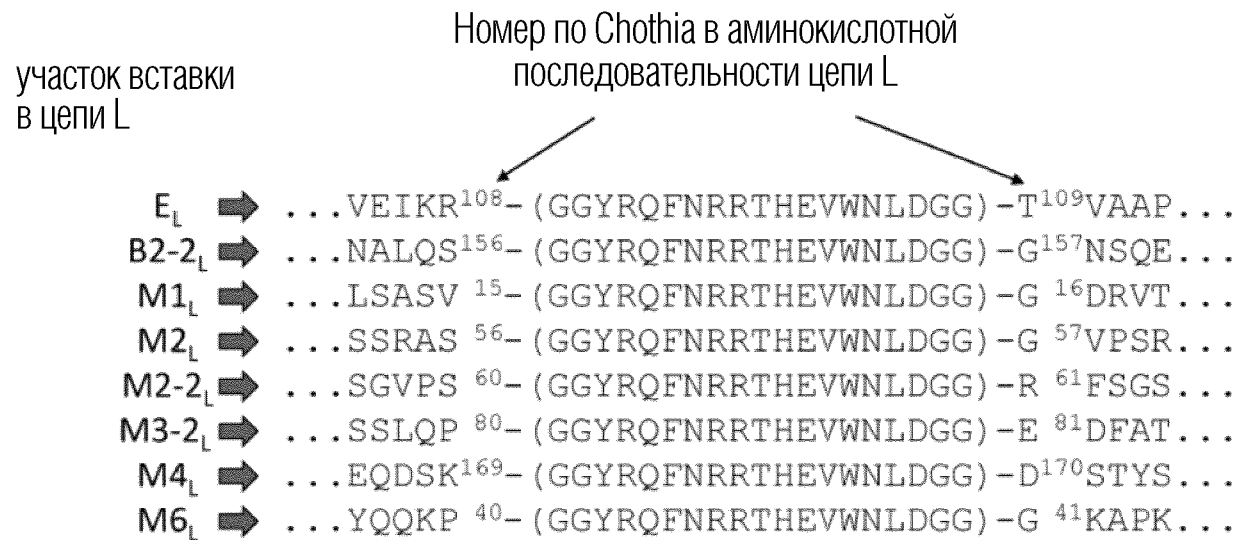
ФИГ. 22

Проверка связывания с Nrp1ec N1-IgG (вставка mP6-9)

Осаждение с р-белком А



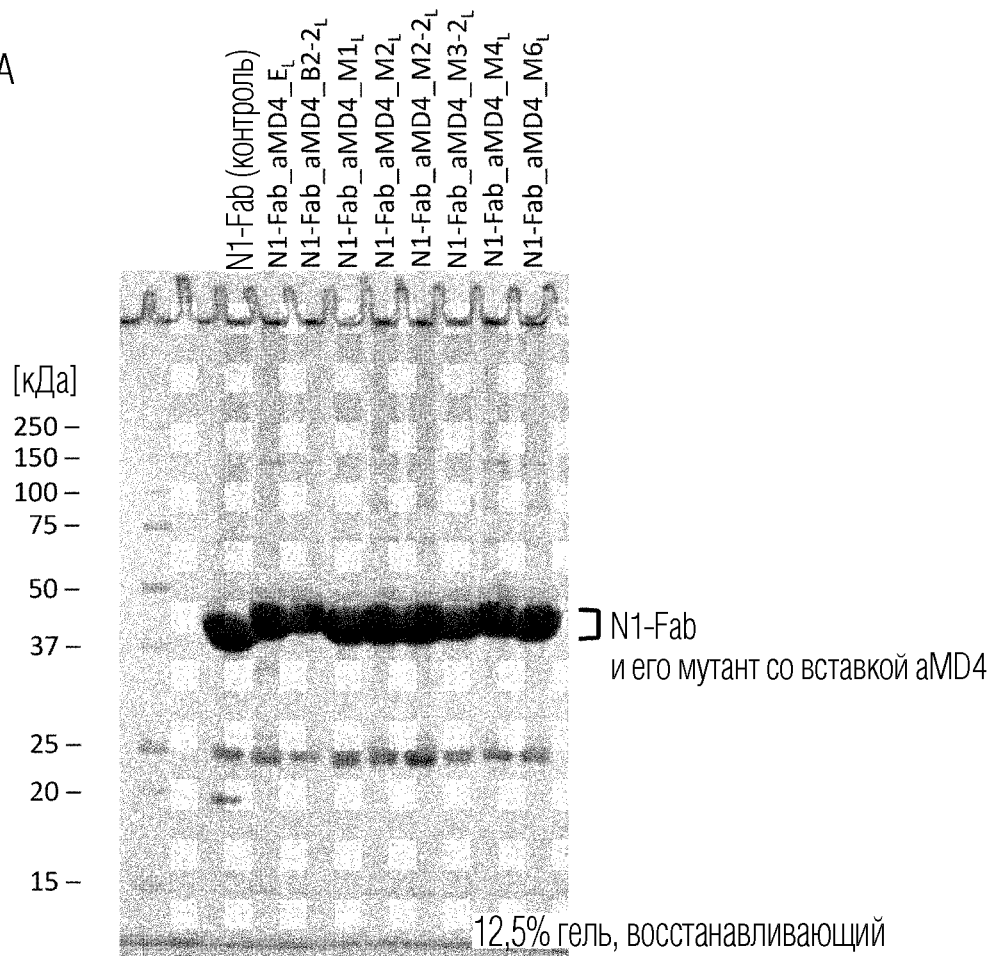
ФИГ. 23



ФИГ. 24

Проверка экспрессии N1-Fab (вставка aMD4)

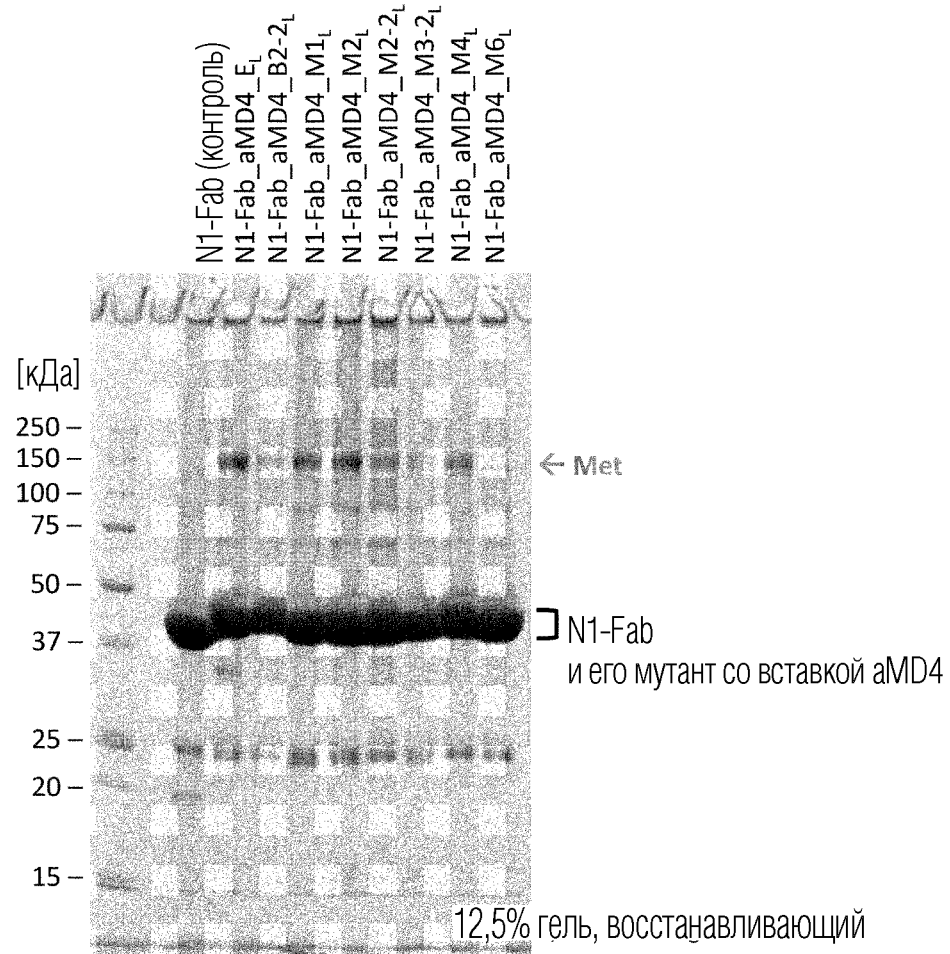
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 25

Проверка связывания с Met N1-Fab (вставка aMD4)

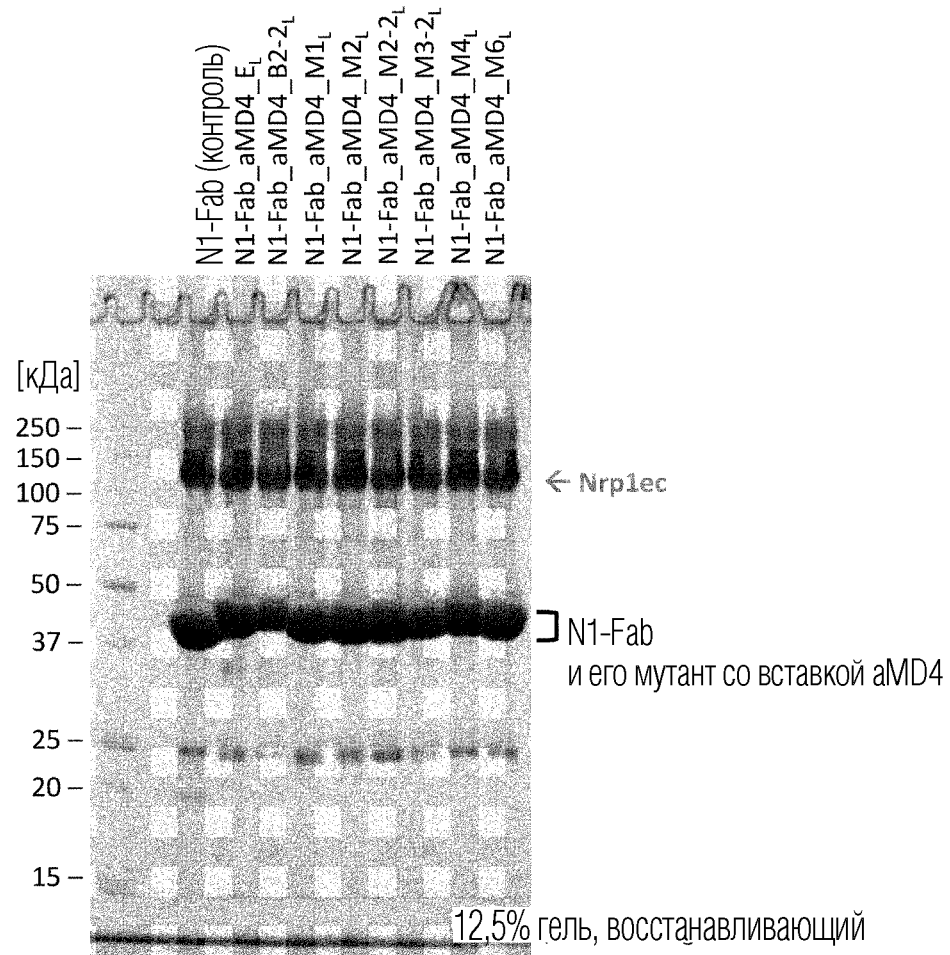
Осаждение на Ni-NTA



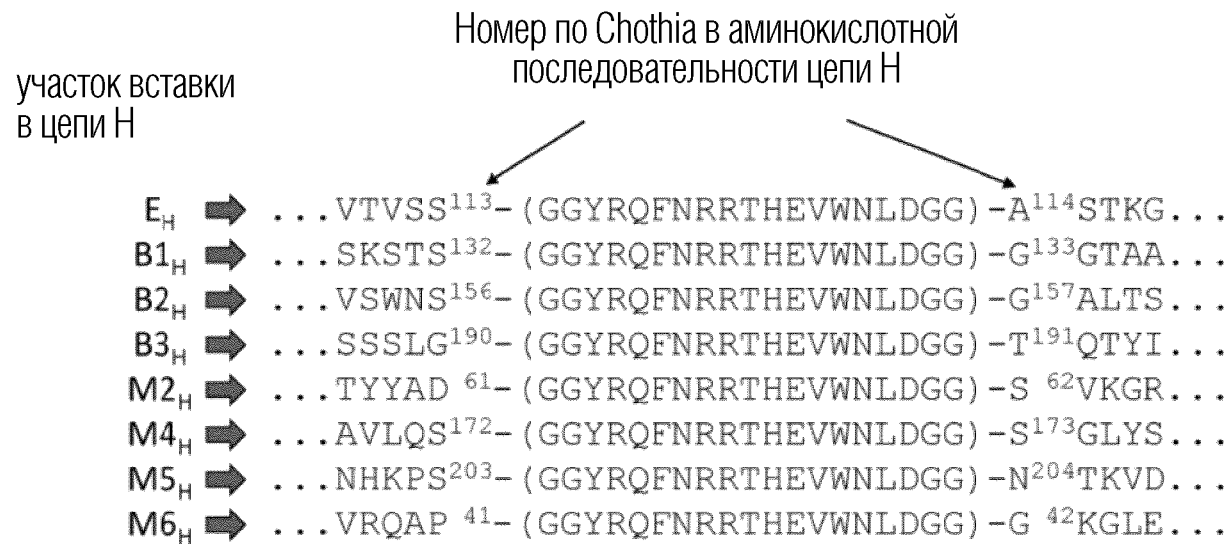
ФИГ. 26

Проверка связывания с Nrp1ec N1-Fab (вставка aMD4)

Осаждение на Ni-NTA



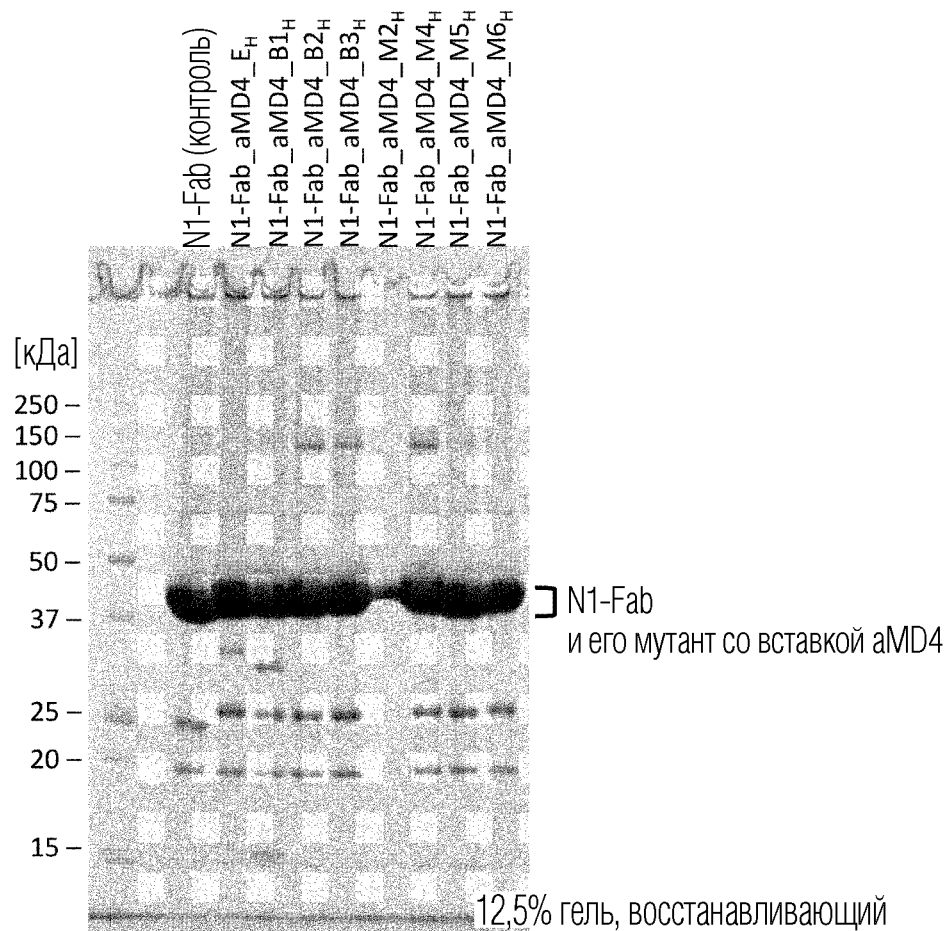
ФИГ. 27



ФИГ. 28

Проверка экспрессии N1-Fab (вставка aMD4)

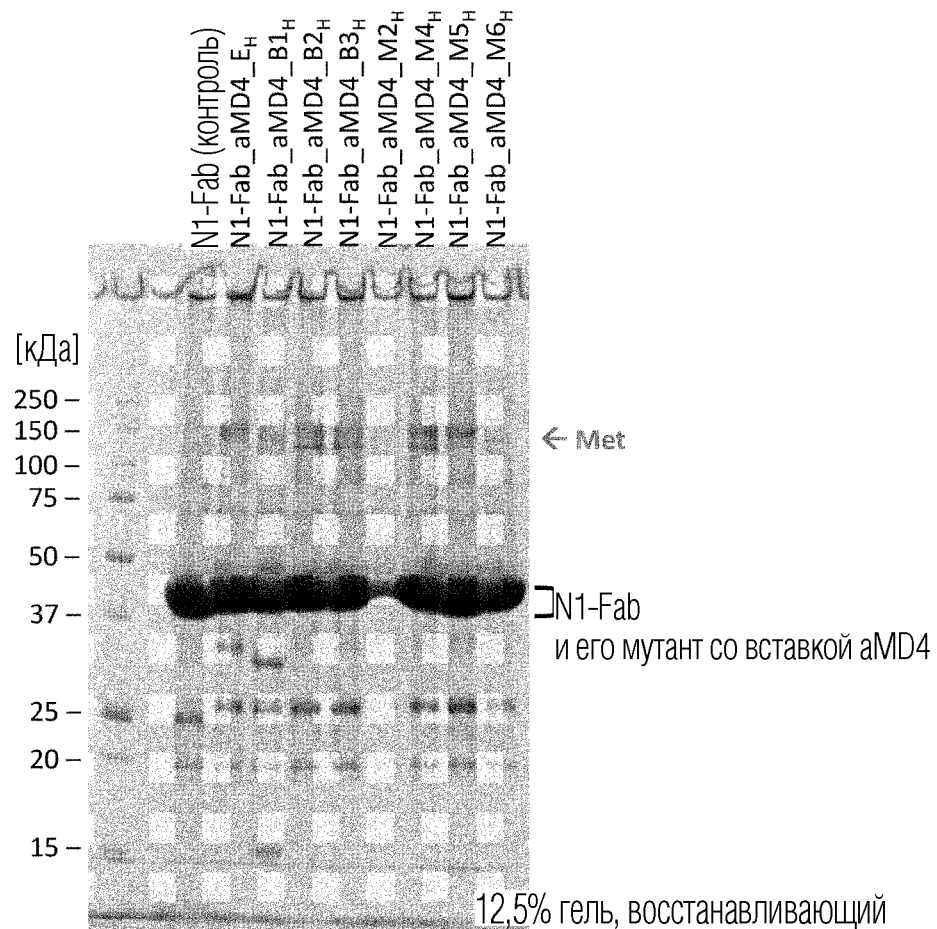
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 29

Проверка связывания с Met N1-Fab (вставка aMD4)

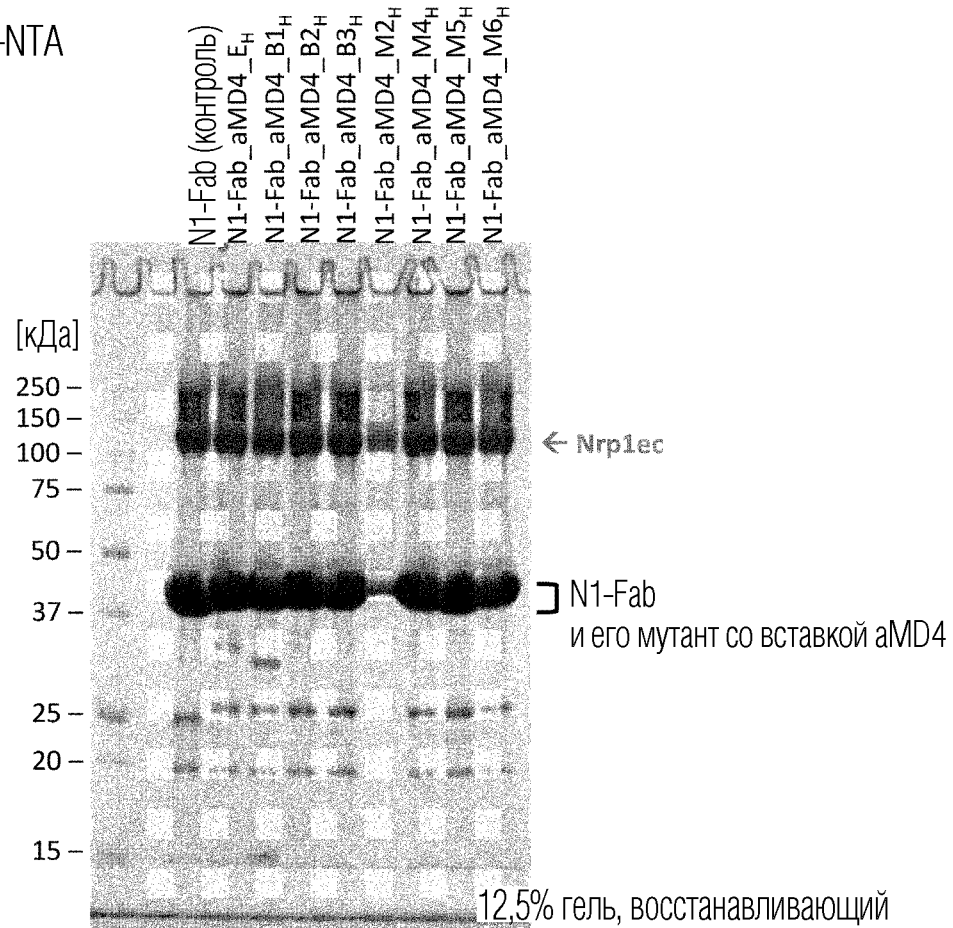
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 30

Проверка связывания с Nrp1ec N1-Fab (вставка aMD4)

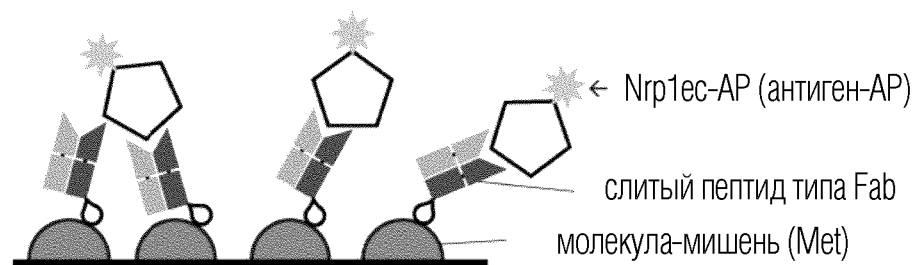
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 31

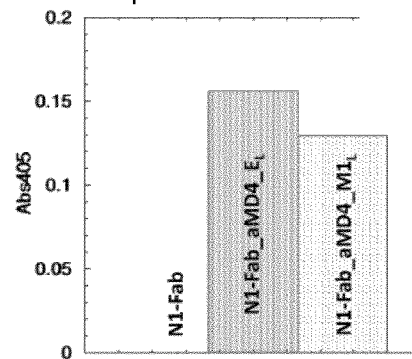
Проверка связывания с Nrp1ec, Met N1-Fab (вставка aMD4)

(A) Анализ AP

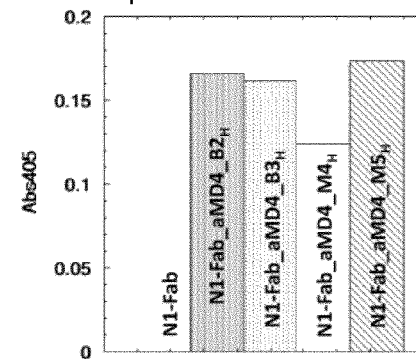


(B)

Вставка aMD4 в цепь L



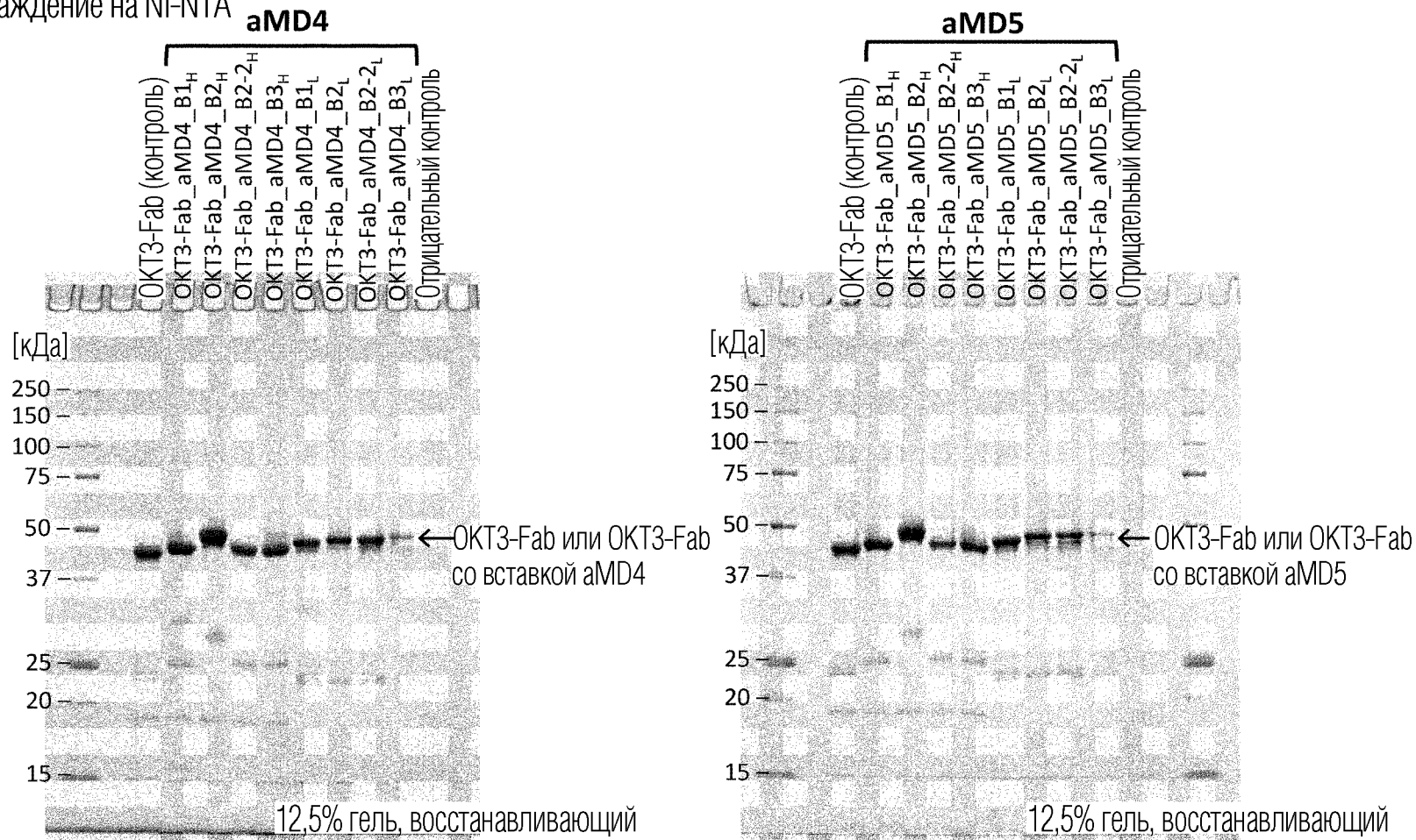
Вставка aMD4 в цепь H



ФИГ. 32

Проверка экспрессии ОКТ3-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

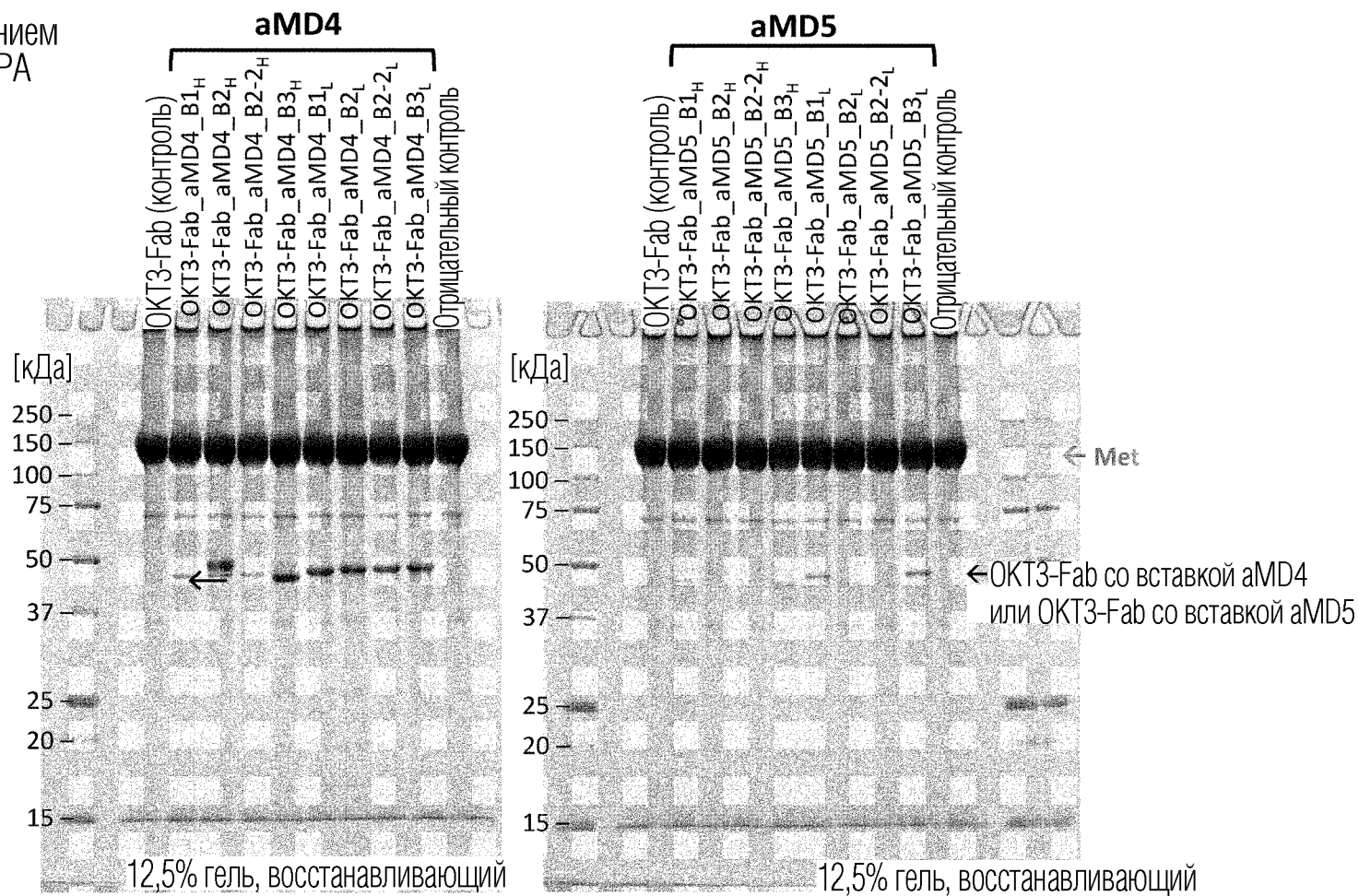
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 33

Проверка связывания с Met ОКТ3-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

Осаждение с использованием антитела против метки РА

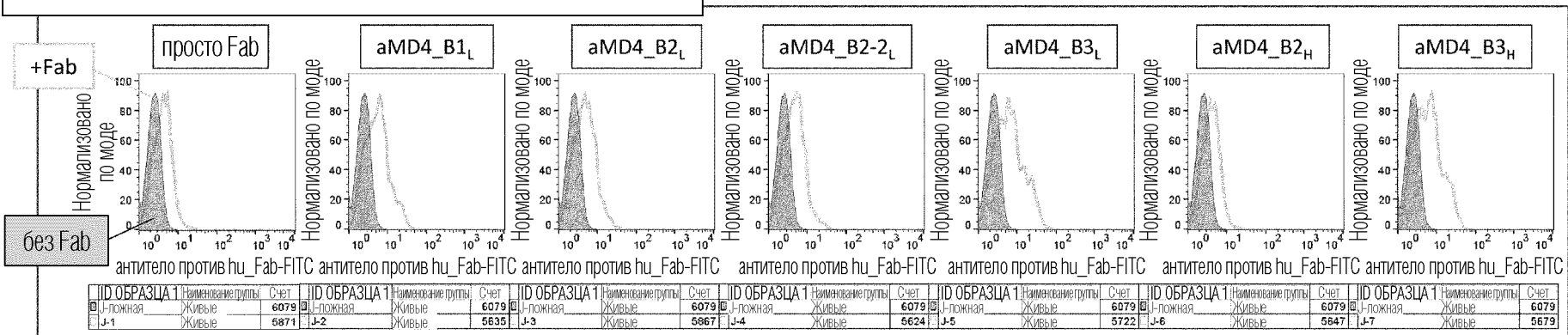


34/49

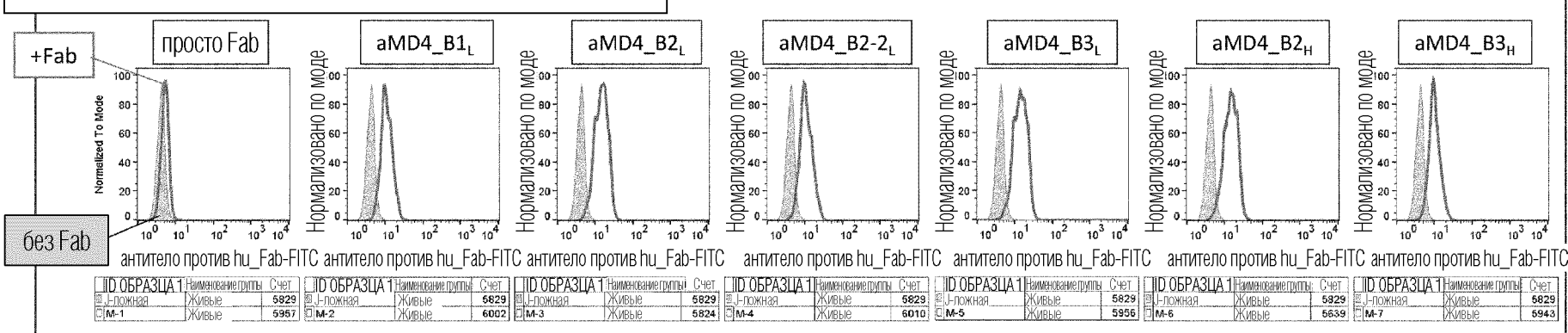
ФИГ. 34

Проверка связывания ОКТ3-Fab (вставка aMD4) с CD3 и Met на клеточной поверхности посредством FACS

Связывание с CD3 клеточной поверхности (клетки Jurkat)



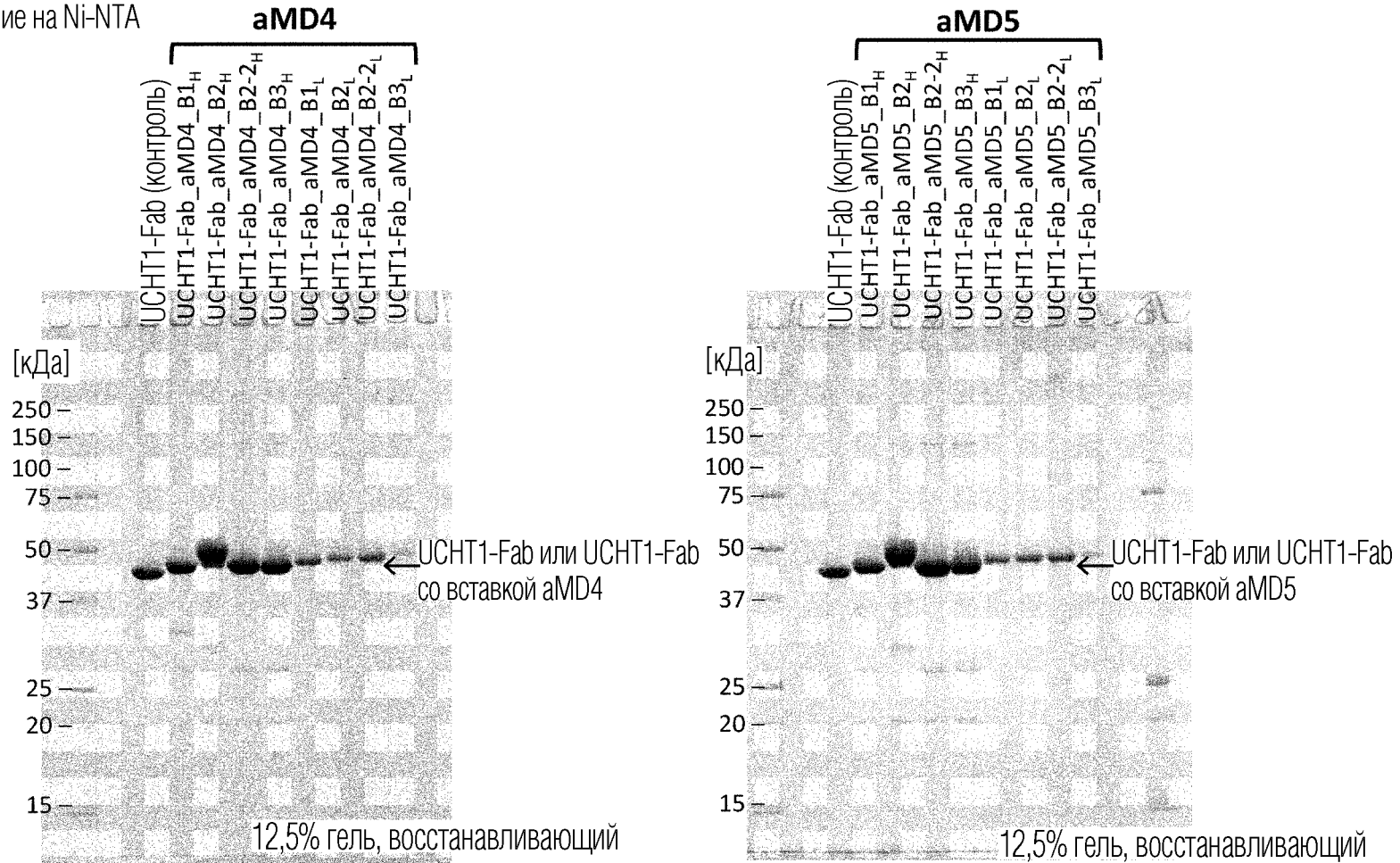
Связывание с Met клеточной поверхности (Met-CHO)



ФИГ. 35

Проверка экспрессии UCHT1-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

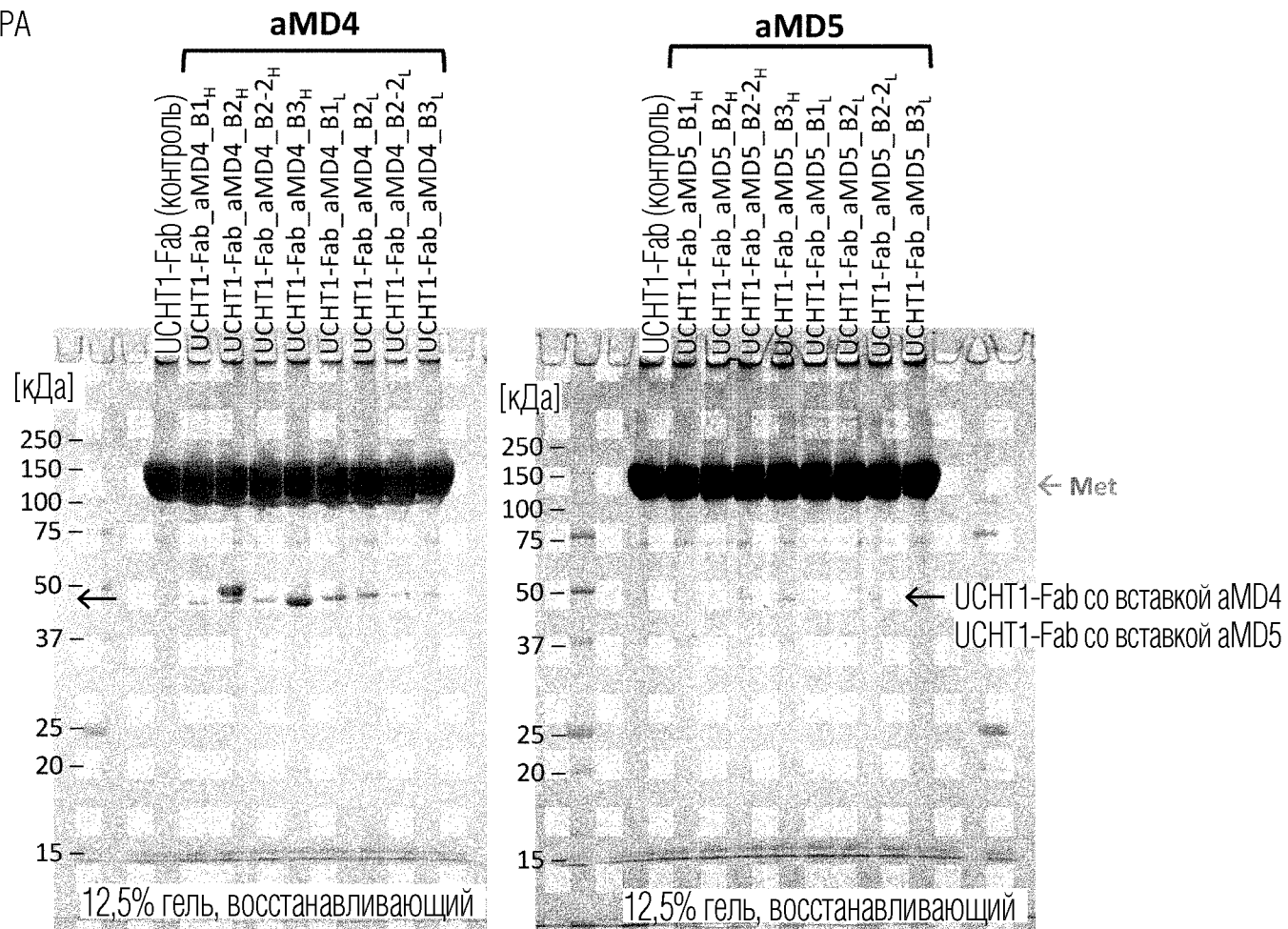
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 36

Проверка связывания с Met UCHT1-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

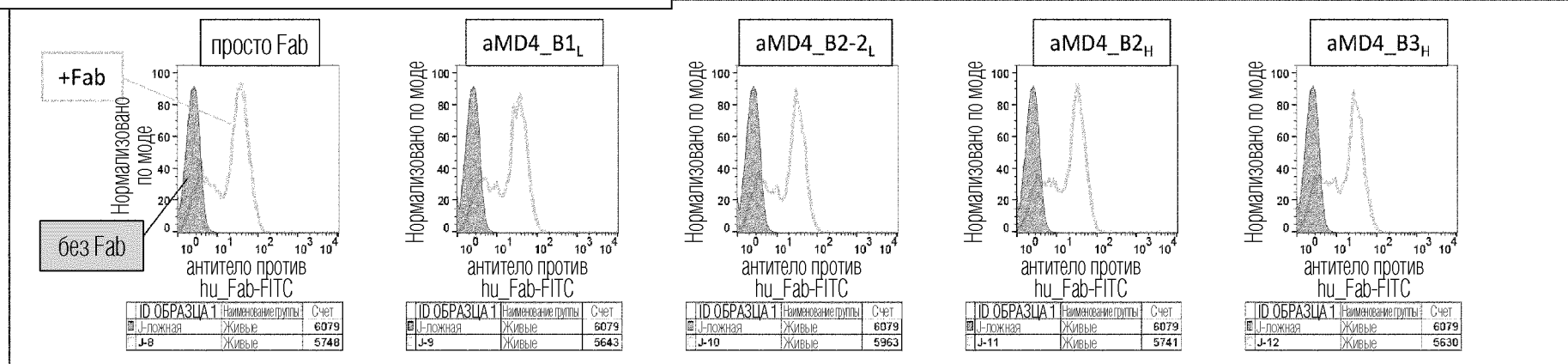
Осаждение с использованием антитела против метки РА



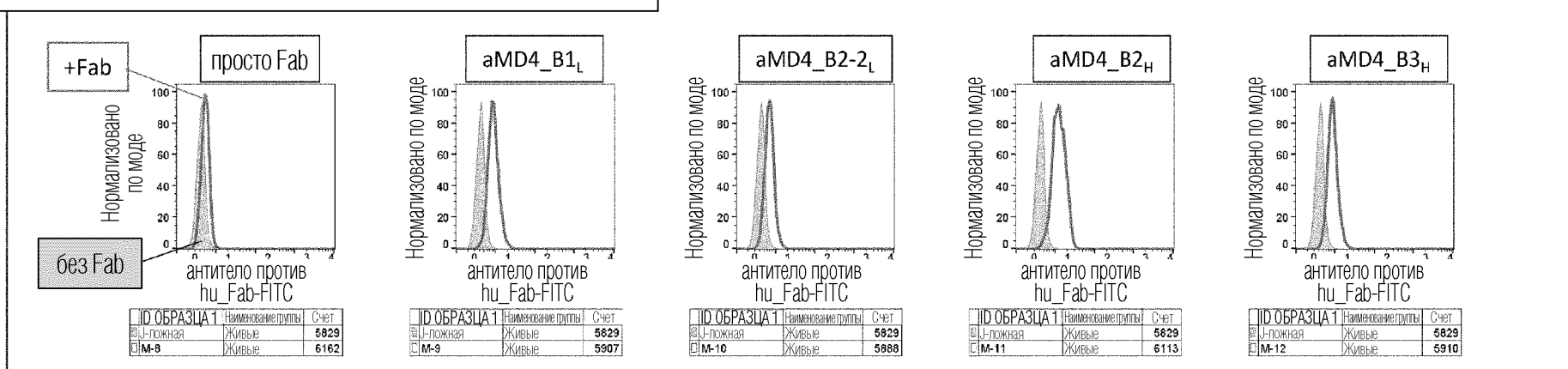
ФИГ. 37

Проверка связывания UCHT1-Fab (вставка aMD4) с CD3 и Met на клеточной поверхности посредством FACS

Связывание с CD3 клеточной поверхности (клетки Jurkat)



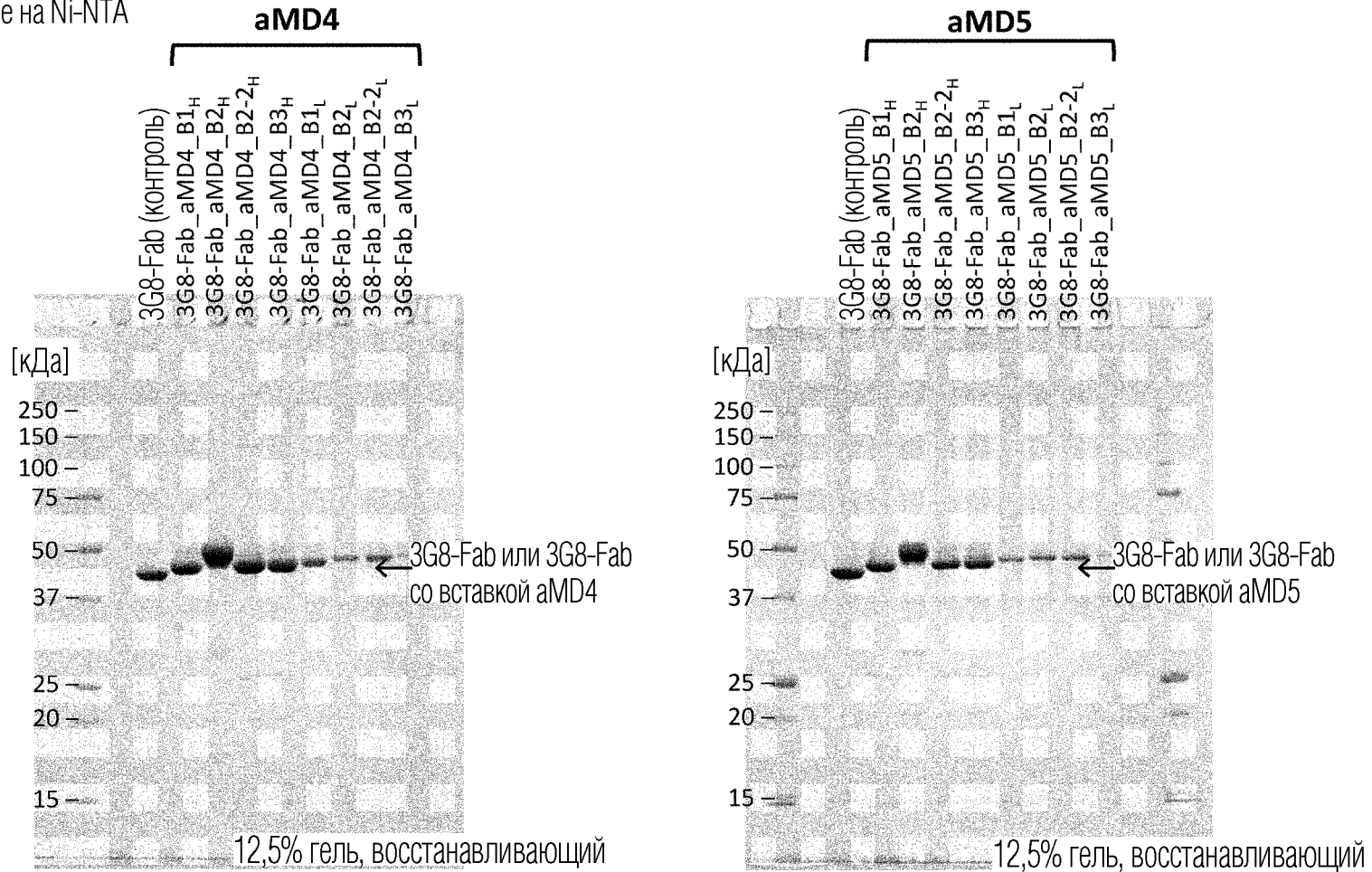
Связывание с Met клеточной поверхности (Met-CHO)



ФИГ. 38

Проверка экспрессии 3G8-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

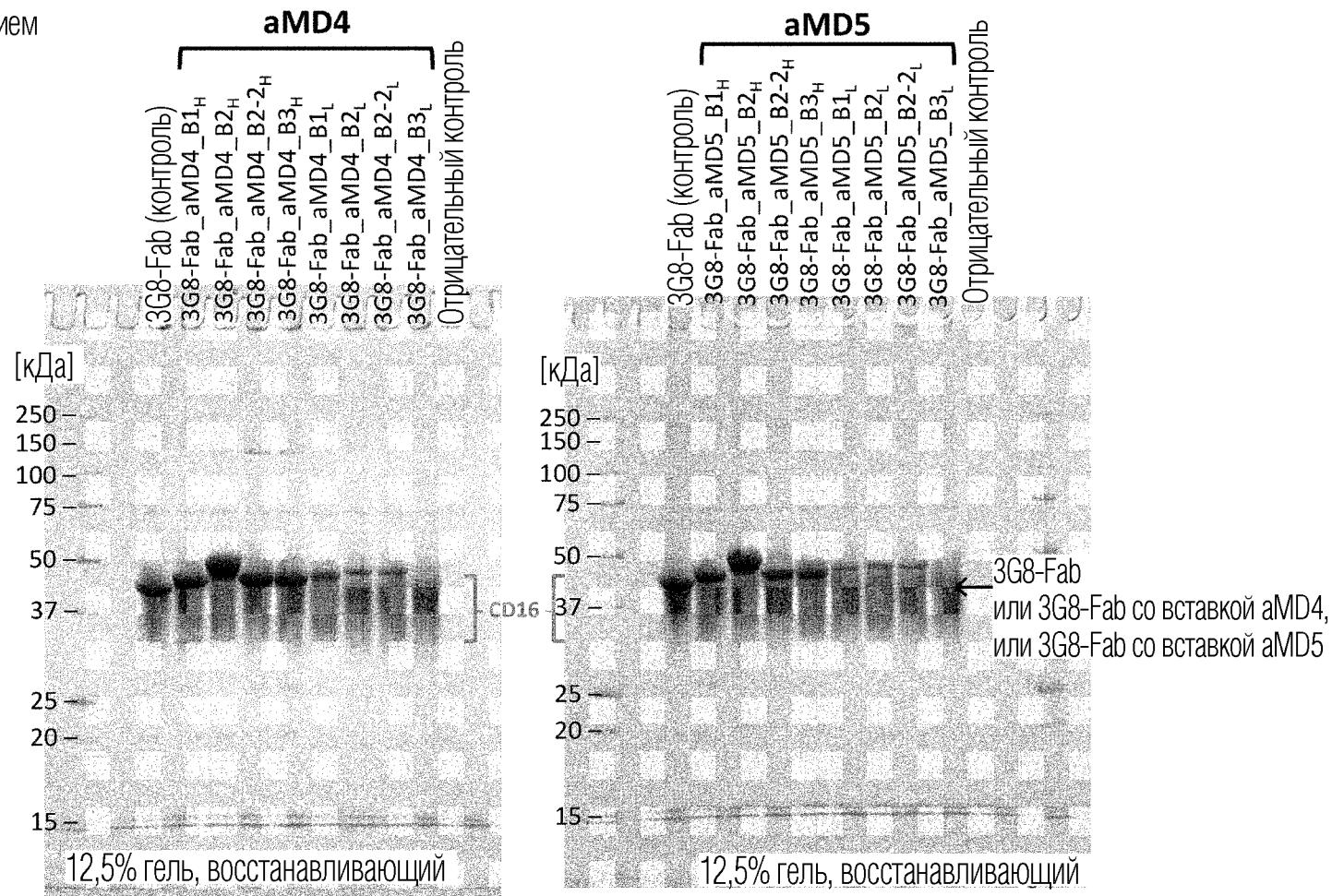
Осаждение на Ni-NTA



ФИГ. 39

Проверка связывания с CD16 3G8-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

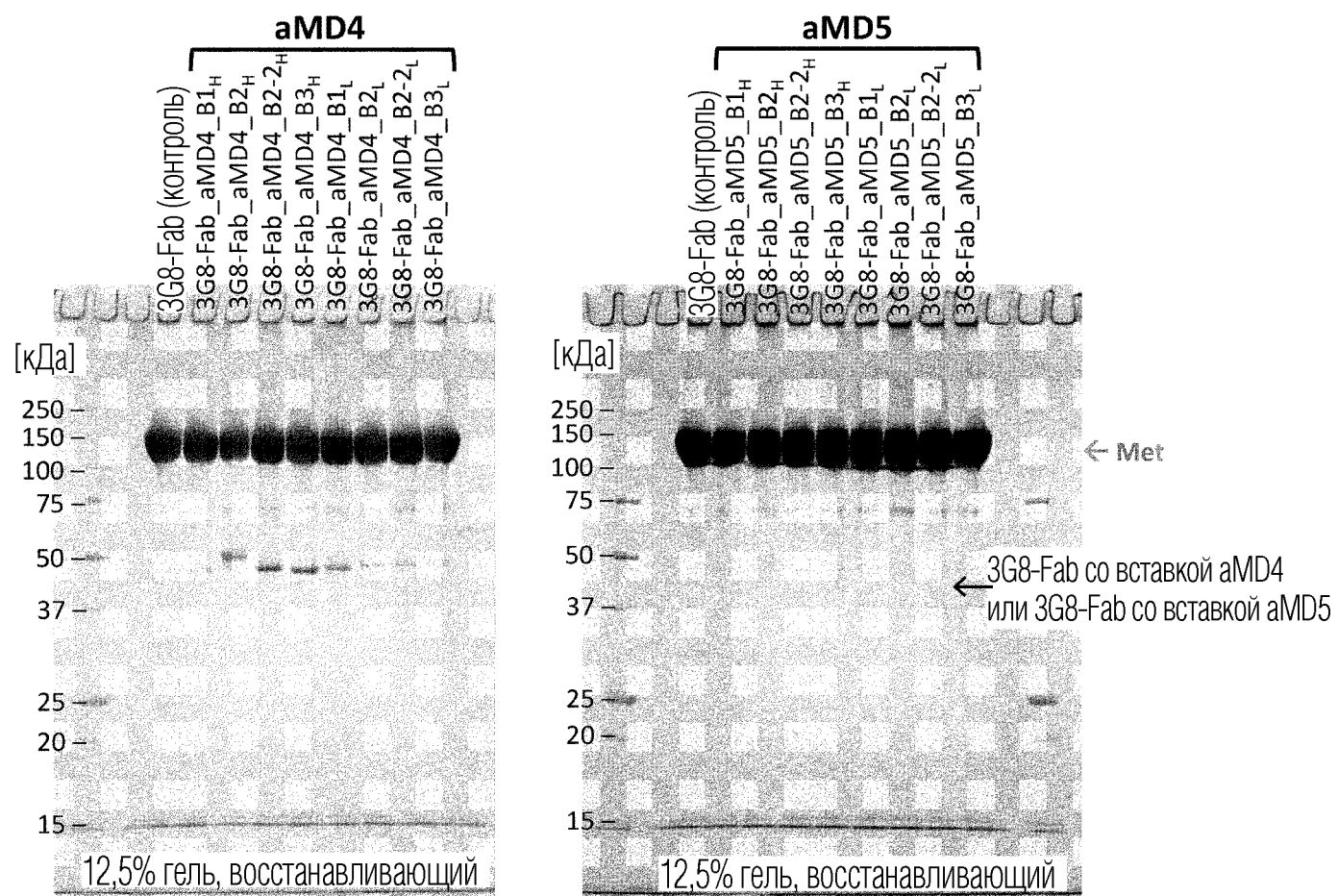
Осаждение с использованием антитела против метки РА



ФИГ. 40

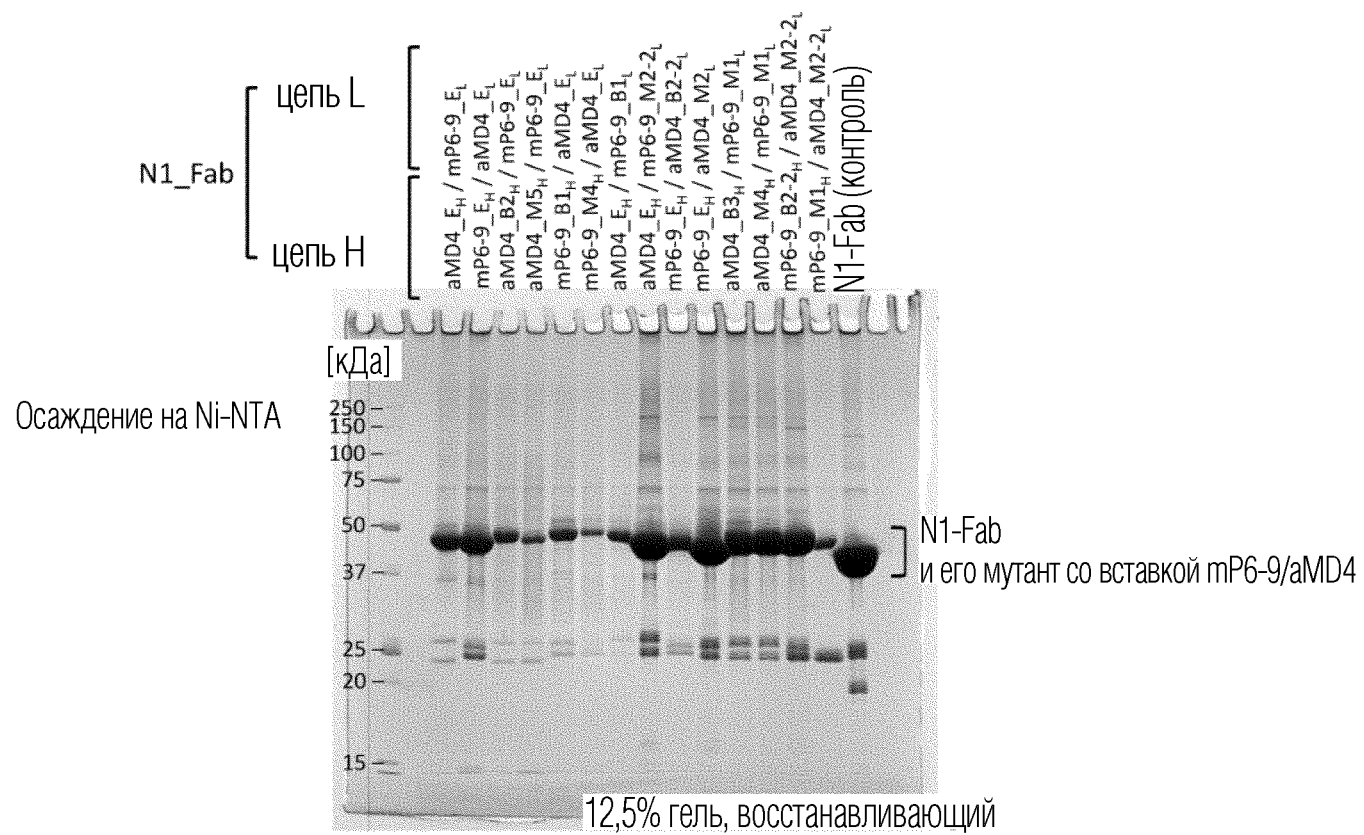
Проверка связывания с Met 3G8-Fab (вставка aMD4 или aMD5)

Осаждение с использованием антитела против метки РА



ФИГ. 41

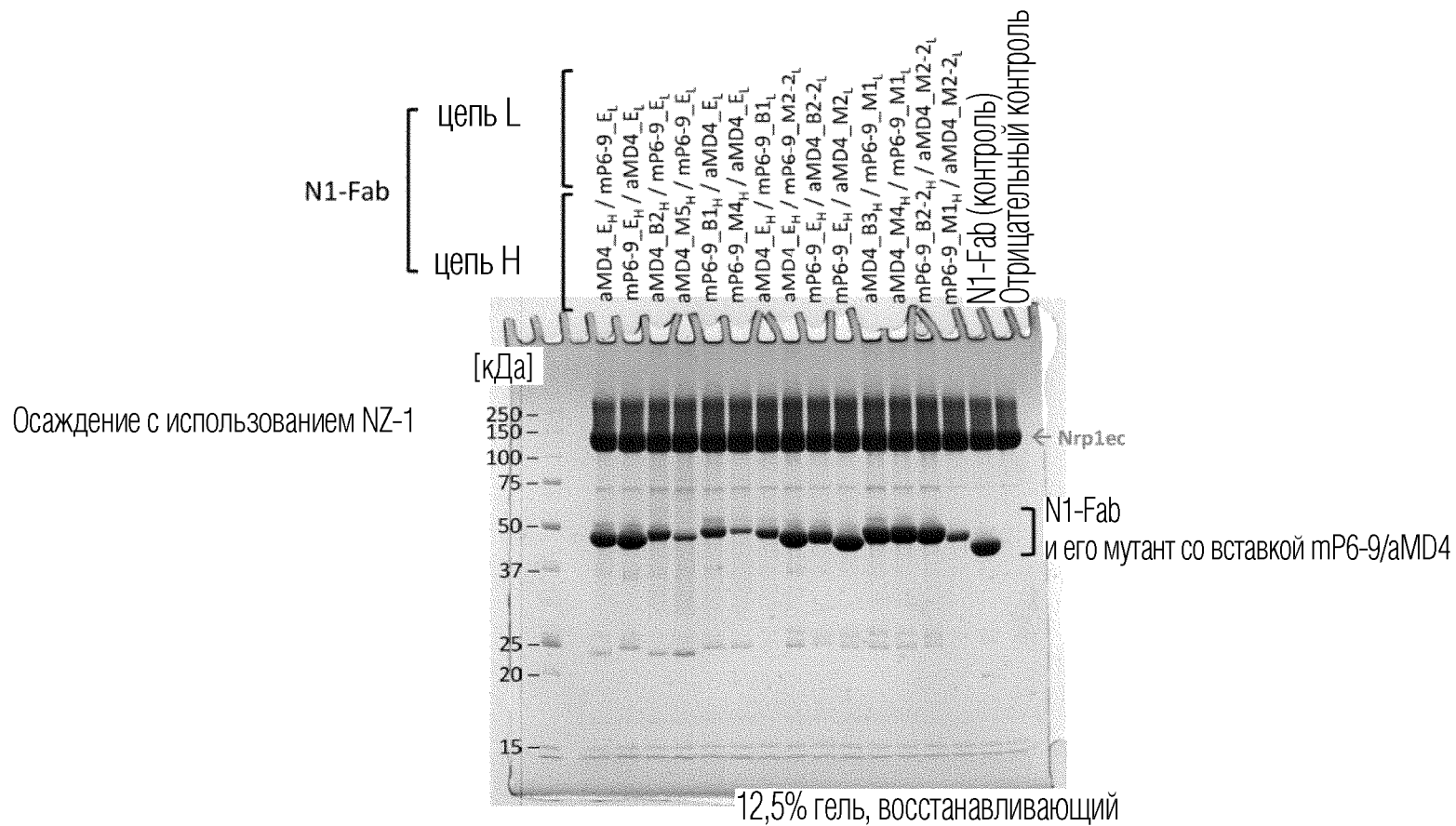
Проверка экспрессии N1-Fab (вставка mP6-9/aMD4 в цепи L или H)



42/49

ФИГ. 42

Проверка связывания с Nrp1ec N1-Fab (вставка mP6-9/aMD4 в цепи L или H)

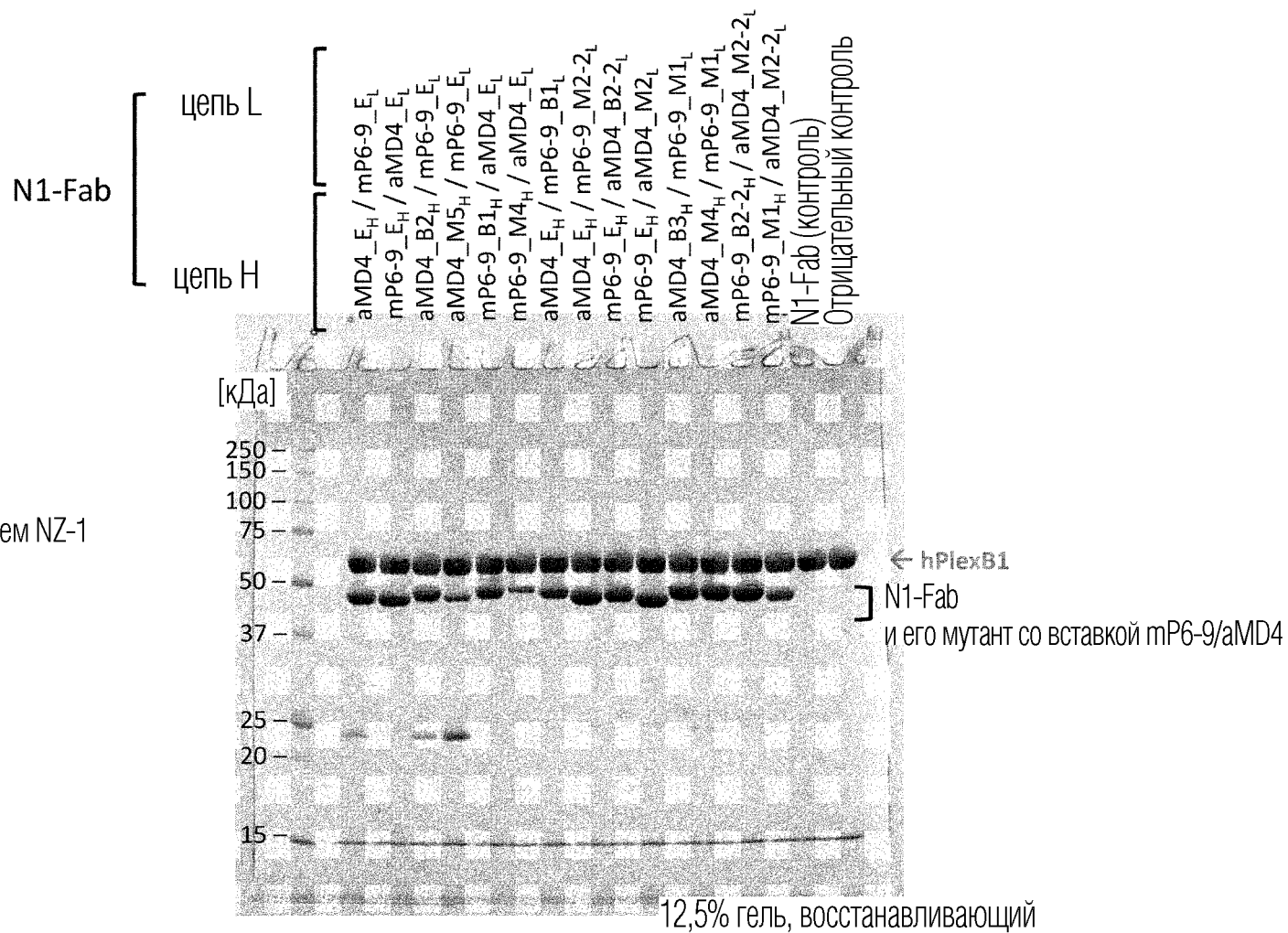


43/49

ФИГ. 43

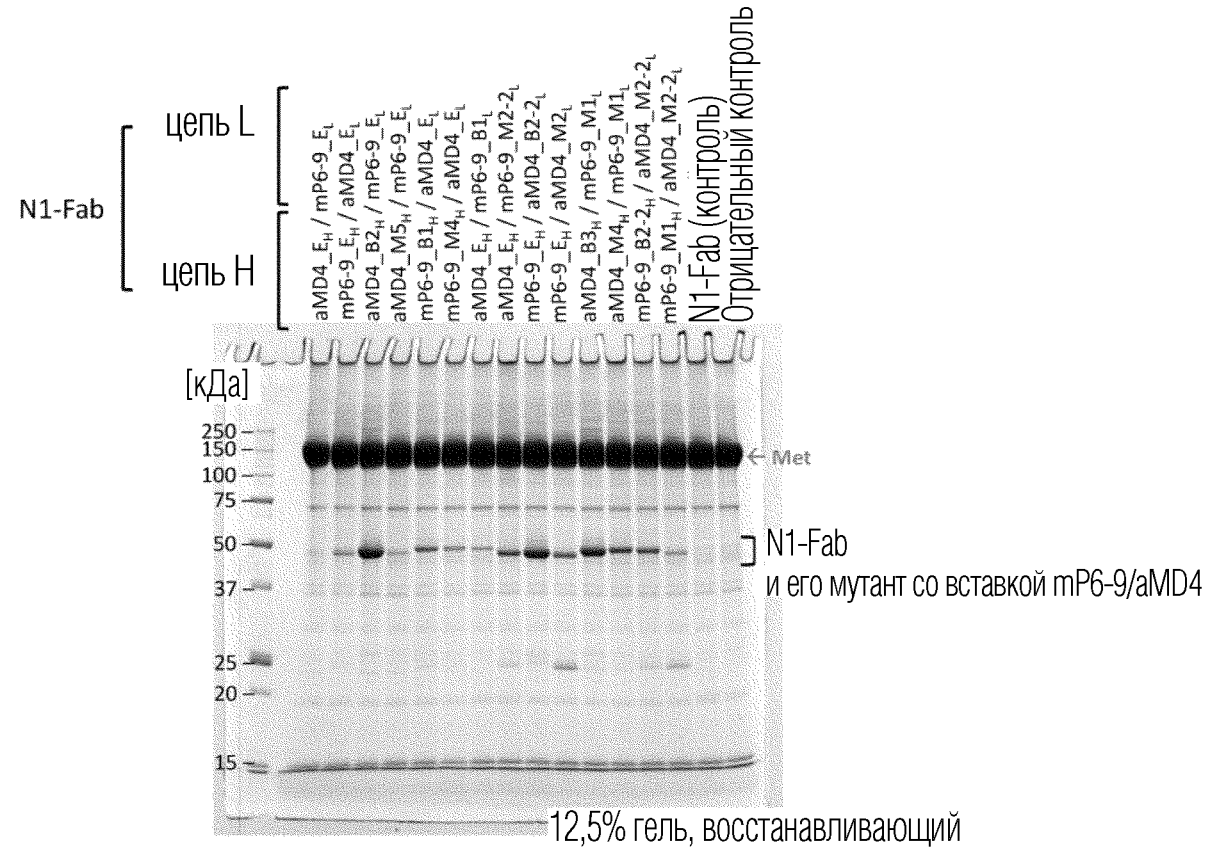
Проверка связывания с hPlexB1 N1-Fab (вставка mP6-9/aMD4 в цепи L или H)

Осаждение с использованием NZ-1



ФИГ. 44

Проверка связывания с Met N1-Fab (вставка пептида mP6-9/aMD4 в цепи L или H)

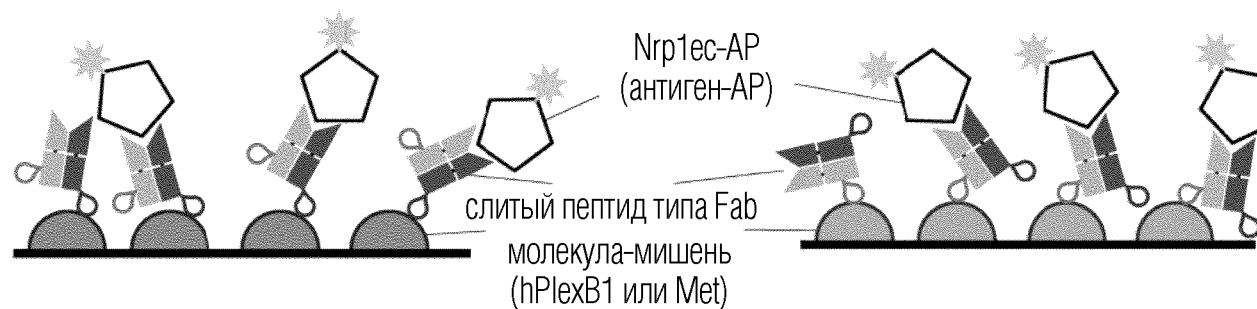


45/49

ФИГ. 45

Проверка связывания N1-Fab (вставка mP6-9/aMD4 в цепи L или H)

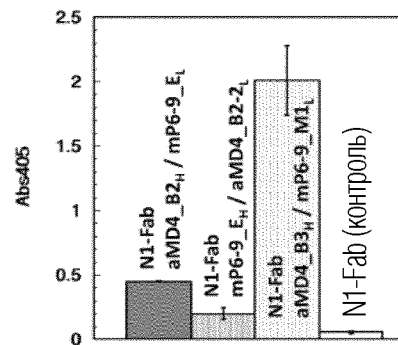
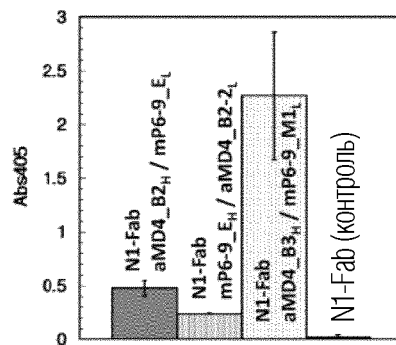
(A) Анализ AP



(B)

С покрытием hPlexB1
(Abs405 через 10 мин)

С покрытием Met
(Abs405 через 30 мин)



ФИГ. 46

YW64.3(человек, IgG1), тяжелая цепь

```

<---СИГНАЛ----->                <-----H1---->                <-----H2----->
Chothia          1      10      20      26  31ab  36  40      5052abc54      60  65
YW64.3          MESQTQVLMFLLLVSGAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSS--EPISWVRQAPGKLEWVSSITG--KNGYTTYADSVKG

----- область V -----><----- область D -----><-----J----->
Chothia          70      82abc84  90      100abcdefghijklmnopqrstuvw103  110113      <----- CH1-----
YW64.3          RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYGM-----DVGWQGTLLVTVSS ASTRGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCL

-----CH1-----> <----- шарнир ----->
YW64.3          VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK-SCDKTHTCPPCPAPELLGGPS

<-----CH2----->
YW64.3          VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

<-----CH3----->
YW64.3          KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

----->
YW64.3          SRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

47/49

ФИГ. 47

YW64.3 (человек, IgG1), тяжелая цепь, конструкция Fab

```

<----СИГНАЛ----->                <-----H1----->                <-----H2----->
Chothia      1      10      20      26  31ab  36  40      5052abc54  60  65
YW64.3      MESQTQVLMFLLWVSGAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSS--EPISWVRQAPGKGLEWVSSITG--KNGYTTYADSVKG

----- область V -----><----- область D -----><-----J----->
                                     <-----H3----->                <-----CH1----->
Chothia      70      82abc84  90      100abcdefghijklmnopqrstuvw103  110113  120      130      140
YW64.3      RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYGM-----DVGWQGTLVTVSS ASTRGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL

-----CH1----->                <His6->
Chothia      150      160      170      180      190      200      210      220
YW64.3      VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSRHHHHHH

```

48/49

YW64.3 (человек, каппа), легкая цепь

```

Chothia          1      10      23      30abcdef32 35      49      56
YW64.3  --MESQTQVLMFLLWVSGAAADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSIS-----SYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRAS

----- область VL -----<----- JL ---->
Chothia          58      66ab 70      80      8890 9395abcde96 100 104 108      120      130
YW64.3  GVPSRFSGSG--SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVP-----ITFGQGTKVEIK R-TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

-----CL1----->
Chothia          140      150      160      170      180      190      200      210
YW64.3  CLLNMFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS-TYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

49/49

ФИГ. 49