



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.04.28

(21) Номер заявки
201170762

(22) Дата подачи заявки
2009.12.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(54) ЕДИНИЧНЫЙ ВАРИАБЕЛЬНЫЙ ДОМЕН ИММУНОГЛОБУЛИНА И ВЫДЕЛЕННЫЙ УСТОЙЧИВЫЙ К ПРОТЕАЗЕ ПОЛИПЕПТИД, СВЯЗЫВАЮЩИЕ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН ЧЕЛОВЕКА

(31) **61/120,135**

(32) **2008.12.05**

(33) **US**

(43) **2011.12.30**

(86) **PCT/EP2009/066395**

(87) **WO 2010/063818 2010.06.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛЭКСО ГРУП ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Эневер Кэролин, Есперсен Лоран,
Пупекка Мальгожата, Томлинсон Ян
М (GB)**

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

(56) WO-A2-2008149143
WO-A1-2009121804
HOLT L.J. ET AL.: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB LNKD-DOI:10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, the whole document
WO-A2-2008062457
VAN GAAL LUC F. ET AL.: "Exploiting the antidiabetic properties of incretins to treat type 2 diabetes mellitus: glucagon-like peptide 1 receptor agonists or insulin for patients with inadequate glycemic control?" EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY/EUROPEAN FEDERATION OF ENDOCRINE SOCIETIES, JUN 2008 LNKD-PUBMED:18322302, vol. 158, no. 6, June 2008 (2008-06), pages 773-784, XP002583653, ISSN: 1479-683X, the whole document

LUCY J. HOLT ET AL.: "Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1093/PROTEIN/GZM067, vol. 21, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 283-288, XP007911765, ISSN: 1741-0126 [retrieved on 2008-04-02], page 285-page 288

GREEN B.D. ET AL.: "Novel dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1(7-36)amide have preserved biological activities in vitro conferring improved glucose-lowering action in vivo", JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 31, no. 3, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 529-540, XP002398089, ISSN: 0952-5041, page 531-page 535

GREEN B.D. ET AL.: "N-terminal His7-modification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide generates dipeptidyl peptidase IV-stable analogues with potent antihyperglycaemic activity", JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY, GB LNKD- DOI:10.1677/JOE.0.1800379, vol. 180, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 379-388, XP002384969, ISSN: 0022-0795, page 380-page 384

WO-A2-02095076

ZHANG J. ET AL.: "Pentamerization of Single-domain Antibodies from Phage Libraries: A Novel Strategy for the Rapid Generation of High-avidity Antibody Reagents", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.JMB.2003.09.034, vol. 335, no. 1, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 49-56, XP004476445, ISSN: 0022-2836, page 52-page 54

HARMSSEN M.M. ET AL.: "Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE LNKD- DOI:10.1007/S00253-005-0300-7, vol. 72, no. 3, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 544-551, XP002510773, ISSN: 0175-7598 [retrieved on 2006-02-01], page 546-page 549

(57) Изобретение относится к единичному вариabельному домену иммуноглобулина, специфически связывающему сывороточный альбумин человека; выделенному устойчивому к протеазе полипептиду, содержащему GLP-1 и единичный вариabельный домен и связывающему сывороточный альбумин человека; выделенным или рекомбинантным молекулам нуклеиновой кислоты и содержащим их векторам экспрессии, кодирующим единичный вариabельный домен иммуноглобулина или выделенный устойчивый к протеазе полипептид; клетке-хозяину для экспрессии единичного вариabельного домена иммуноглобулина или выделенного устойчивого к протеазе полипептида.

Предпосылки создания изобретения

Полипептиды и пептиды становятся все более и более важными агентами при ряде применений, включающем промышленные применения и применение в качестве медико-санитарных, терапевтических и диагностических средств. Однако многие терапевтические пептиды, полипептиды и белки особенно чувствительны к деградации *in vivo* природными протеазами. Кроме того, при определенных физиологических состояниях, таких как воспалительные состояния (например, COPD) и рак, количество протеаз, присутствующих в ткани, органе или животном (например, в легком, в опухоли или вблизи нее), может увеличиваться. Это увеличение протеаз может привести к ускоренной деградации и инактивации эндогенных белков и терапевтических пептидов, полипептидов и белков, которые вводятся для лечения заболевания. Соответственно, некоторые агенты, обладающие потенциалом для применения *in vivo* (например, применения при лечении, диагностировании или профилактике заболевания у млекопитающих, таких как люди), имеют лишь ограниченную эффективность, поскольку они быстро деградируются и инактивируются протеазами.

Устойчивые к протеазам полипептиды обеспечивают несколько преимуществ. Например, устойчивые к протеазам полипептиды остаются активными *in vivo* дольше, чем чувствительные к протеазам агенты и, соответственно, остаются функциональными в течение периода времени, который является достаточным для вызова биологических эффектов. Существует потребность в улучшенных способах отбора полипептидов, являющихся устойчивыми к деградации протеазами, а также обладающими желаемой биологической активностью.

Глюканоподобный пептид (GLP)-1 является гормоном инкретином с сильными глюкозозависимыми инсулинотропными и глюкагоностатическими действиями, трофическими эффектами на β -клетки поджелудочной железы и ингибиторными эффектами на секреторную и сократительную способности желудочно-кишечного тракта, которые при объединении понижают уровень глюкозы в плазме и уменьшают колебания уровней глюкозы. GLP-1 является агонистом рецептора GLP-1. Кроме того, благодаря своей способности к увеличению чувства насыщения GLP-1 уменьшает потребление пищи, ограничивая, тем самым, увеличение веса, и может даже быть причиной снижения веса. Вместе взятые, эти действия обеспечивают GLP-1 уникальный профиль, считающийся в высокой степени желательным для противодиабетического средства, в частности, поскольку глюкозозависимость его антигипергликемических эффектов должна минимизировать любой риск тяжелой гипогликемии. Однако его фармакокинетический/фармакодинамический профиль таков, что нативный GLP-1 не является терапевтически полезным. Таким образом, несмотря на то, что GLP-1 является наиболее эффективным при непрерывном введении, однократные подкожные инъекции оказывают быстроисчезающие эффекты. GLP-1 является в высокой степени чувствительным к ферментативной деградации *in vivo*, а расщепление дипептидилпептидазой IV (DPP-IV), вероятно, является самым важным, поскольку оно происходит быстро и создает неинсулинотропный метаболит. Поэтому интенсивное исследование было сфокусировано на стратегиях для использования терапевтического потенциала GLP-1 на основе понимания факторов, оказывающих влияние на его метаболическую стабильность и фармакокинетический/фармакодинамический профиль.

Была проведена обширная работа в попытке ингибировать пептидазу или модифицировать GLP-1 так, чтобы его деградация замедлялась при сохранении биологической активности. В WO 05/027978 (US2007203058) описываются производные GLP-1, имеющие длительный профиль действия (и включенные сюда посредством ссылки в качестве примеров производных и аналогов GLP-1, которые могут использоваться в настоящем изобретении). В WO 02/46227 (US2004053370) описываются гетерологичные гибридные белки, включающие полипептид (например, альбумин), слитый с GLP-1 или его аналогами (описание этих аналогов включено сюда посредством ссылки в качестве примеров аналогов GLP-1, которые могут использоваться в настоящем изобретении). В WO 05/003296, WO 03/060071, WO 03/059934 описывается гибридный белок, в котором аминоконец GLP-1 был слит с альбумином в попытке удлинения периода полувыведения гормона.

Однако, несмотря на эти попытки активный GLP-1 с длительным периодом действия не был получен.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к единичному вариабельному домену иммуноглобулина, специфически связывающему сывороточный альбумин человека, где указанный единичный вариабельный домен иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

Настоящее изобретение также относится к выделенному устойчивому к протеазе полипептиду, связывающему сывороточный альбумин человека, где указанный полипептид содержит GLP-1, связанный с вышеуказанным единичным вариабельным доменом иммуноглобулина посредством линкера с аминокислотной последовательностью PSS, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Настоящее изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует вышеуказанный единичный вариабельный домен иммуноглобулина.

Настоящее изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует вышеуказанный выделенный полипептид.

Вариантом настоящего изобретения является выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:23.

Настоящее изобретение также относится к вектору экспрессии, включающему одну из вышеуказанных выделенных молекул нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину для экспрессии вышеуказанного единичного варибельного домена иммуноглобулина или выделенного устойчивого к протеазе полипептида, включающей вышеуказанную молекулу нуклеиновой кислоты или вышеуказанный вектор.

Вариантом настоящего изобретения является клетка-хозяин, являющаяся клеткой вида *Pichia*.

Настоящее изобретение относится к способам отбора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов и способам отбора пептидов или полипептидов, которые связываются с лигандом-мишенью с высокой аффинностью. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу получения набора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов.

В одном аспекте изобретением является способ отбора устойчивого к протеазе пептида или полипептида. Способ включает получение набора пептидов или полипептидов, инкубацию набора и протеазы в условиях, подходящих для проявления активности протеазой, и выделение пептида или полипептида, обладающего желаемой биологической активностью, посредством чего отбирают устойчивый к протеазе пептид или полипептид.

В одном варианте осуществления набор пептидов или полипептидов экспрессируют в дисплейной системе, а протеазой является протеаза, которая экспрессируется в дисплейной системе или экспрессионном хозяине. Например, в одном варианте осуществления набор пептидов или полипептидов экспрессируют в бактериальных клетках, а протеазой является эндогенная по отношению к бактериям протеаза. Подходяще, когда условия для экспрессии набора максимизируют экспрессию и активность эндогенной протеазы, такой как бактериальная протеаза. Экспрессию и активность протеазы максимизируют, например, посредством увеличения периода времени и/или температуры для экспрессии набора белков в бактериях. Например, период времени инкубации может составлять от 1 ч до включающего ночь периода (например, от 12 вплоть до 24 ч) или дольше (например, от 24 вплоть до 48 ч или дольше). В одном варианте осуществления температура может составлять от 30 до 37°C или более. Кроме того, экспрессию протеазы можно увеличить посредством использования различных бактериальных штаммов и/или модификации ингредиентов сред. Можно также изменять плотность бактериальной культуры. В другом варианте осуществления дисплейная система может быть модифицирована, например, посредством генетической модификации для увеличения экспрессии протеазы.

В одном варианте осуществления набор обеспечивается в виде системы бактериофагового дисплея, в которой набор бактериофагов экспрессируют и/или увеличивают в численности в бактериальных клетках *E.coli*, таких как клетки *E.coli* TB1, клетки TC1 или клетки штамма HB2151 *E.coli*. Соответственно, в этом варианте осуществления бактериальной протеазой является протеаза, эндогенно экспрессируемая в клетках *E.coli*. В одном варианте осуществления бактериальной протеазой может быть протеаза, которая экспрессируется в бактериальной периплазме. В одном варианте осуществления экспрессия протеазы может происходить во время продукции фага, его секреции или присутствовать в бактериальном супернатанте.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечивается способ, включающий стадии получения библиотеки бактериофагов; экспрессии указанной библиотеки в бактериях в условиях, подходящих для проявления активности бактериальной протеазой; инкубации указанной экспрессированной библиотеки с лигандом-мишенью, посредством чего отбирают устойчивый к протеазе, связывающий мишень пептид. Необязательно указанная инкубация с лигандом-мишенью включает присутствие дополнительной протеазы.

В другом варианте осуществления дисплейной системой является система дисплея в дрожжах, например, *Pichia*, а протеазой является эндогенная протеаза, которая экспрессируется в дрожжевых клетках.

В одном варианте осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, включает объединение набора и дополнительной протеазы в условиях, подходящих для активности указанной дополнительной протеазы, и выделение пептида или полипептида, обладающего желаемой биологической активностью, посредством чего отбирают устойчивый к протеазе пептид или полипептид. В одном варианте осуществления протеазу объединяют с набором в растворе (т.е. протеаза не иммобилизована на подложке). Подходяще, когда дополнительная протеаза обнаруживается в одной или нескольких следующих жидкостях, гомогенатах или экстрактах: сыворотке, мокроте, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярном лаваже, гомогенате ткани легкого, легочном экстракте, панкреатическом экстракте, желудочном соке, слюне или слезах.

В другом аспекте обеспечивается способ отбора устойчивого к протеазе пептида или полипептида. Способ включает получение набора пептидов или полипептидов, инкубацию набора и первой протеазы в условиях, подходящих для активности протеазы, и дополнительно включает объединение набора со второй протеазой в условиях, подходящих для проявления активности протеазой, и выделение пептида или полипептида, обладающего желаемой биологической активностью, посредством чего отбирают устойчи-

вый к протеазе пептид или полипептид. В одном варианте осуществления этого аспекта первой протеазой является протеаза, эндогенная по отношению к системе дисплея набора, а вторую протеазу выбирают из протеазы, обнаруживаемой в сыворотке, мокроте, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярном лаваже, гомогенате ткани легкого, легочном экстракте, панкреатическом экстракте, желудочном соке, слюне или слезах. Однако будет понятно, что этапы с использованием "первой" и "второй" протеазы могут выполняться в любом порядке. Кроме того, будет понятно, что множество повторов любых таких стадий может быть включено в способ настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения указанными условиями для активности указанной дополнительной или второй протеазы являются (i) от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 3 мг/мл протеазы, (ii) от приблизительно 20 до приблизительно 40°C, и (iii) период времени, составляющий по крайней мере приблизительно 30 мин. В одном варианте осуществления эти жесткие условия делают возможным отбор пептидов или полипептидов с высокой аффинностью и/или увеличенной T_m. В таком случае пептиды и полипептиды могут проявлять высокую аффинность в мономерной форме.

В одном варианте осуществления в способах настоящего изобретения в соответствии с любым аспектом, в случае указанных условий, подходящих для активности протеазы, используют от приблизительно 10 до приблизительно 100 мкг/мл протеазы. В случае указанных условий, подходящих для активности протеазы, может использоваться температура, составляющая от приблизительно 30 до приблизительно 37°C (например, приблизительно 37°C или приблизительно комнатная температура). В одном варианте осуществления набор и протеазу можно объединить по крайней мере на приблизительно 1 ч (например, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, включающий ночь период, например, 18-24 ч). В способах настоящего изобретения набор и протеазу инкубируют, в одном варианте осуществления, в течение периода времени, составляющего по крайней мере приблизительно 30 мин. В одном варианте осуществления протеазу используют в концентрации, составляющей приблизительно 100 мкг/мл, а объединенные набор и протеазу инкубируют при приблизительно 37°C в течение по крайней мере приблизительно 1 ч.

В одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения отношение (молярное отношение) протеазы, например, трипсина, к полипептиду или вариабельному домену является составляющим 8000 к 80000 отношением протеаза:вариабельный домен. В одном варианте осуществления отношение (весовое отношение, например, мкг/мкг) протеазы (например, трипсина) к полипептиду или вариабельному домену является составляющим 16000 к 160000 отношением протеаза:вариабельный домен. В одном варианте осуществления протеазу используют в концентрации, составляющей по крайней мере 100 или 1000 мкг/мл протеазы.

В способе в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения может использоваться любая желаемая протеаза, например, одна или несколько из следующих протеаз: сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, аспарагиновые протеазы, тиюловые протеазы, матриксная металлопротеаза, карбоксипептидаза (например, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В), трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластаза, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназа (например, протеиназа 1, протеиназа 2, протеиназа 3), термоллизин, химозин, энтеропептидаза, каспаза (например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 9, каспаза 12, каспаза 13), кальпаин, фицин, клострипаин, актинидаин, бромелаин, сепараза и дипептидилпептидаза IV (DPP-IV). В конкретных вариантах осуществления протеазой является трипсин, эластаза или лейкозим. Протеаза может быть также обеспечена за счет биологического экстракта, биологического гомогената или биологического препарата, например, цельных клеток *in vitro*. Если желательно, способ, кроме того, включает добавление ингибитора протеазы к объединению набора с протеазой после завершения инкубации.

В одном варианте осуществления любого из способов настоящего изобретения протеаза(ы) находится в растворе при объединении с набором.

В одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения желаемой биологической активностью является активность связывания, например, с лигандом, например, лигандом-мишенью или родovým лигандом.

В некоторых вариантах осуществления пептид или полипептид, который обладает желаемой биологической активностью, выделяют на основе активности связывания. Например, пептид или полипептид можно выделить на основе связывания с родовым лигандом, таким как белок А, белок G или белок L. Активностью связывания может быть также специфическое связывание с лигандом-мишенью. Приводимые в качестве примеров лиганды-мишени включают ApoE, Apo-SAA, BDNF, кардиотрофин-1, CEA, CD40, лиганд для CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, рецептор EGF, ENA-78, зотаксин, зотаксин-2, эксодус-2, FAPα, FGF-кислотный, FGF-основной, фактор-10 роста фибробластов, лиганд для FLT3, фракталкин (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, сывороточный альбумин человека, инсулин, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, рецептор IL-1, рецептор IL-1 типа 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 а.к.), IL-8 (77 а.к.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), ингибин α, ингибин β, IP-10, фактор-2 роста кератиноцитов (KGF-2), KGF, лептин, LIF, лимфотактин, анти-Мюллеров гормон,

моноцитарный колониингибирующий фактор, моноцитарный белок-аттрактант, M-CSF, MDC (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, ингибирующий миелоидные предшественники фактор-1 (MIPF-I), NAP-2, нейрутин, фактор роста нервов, β -NGF, NT-3, NT-4, онкостатин M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, фактор стволовых клеток (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, фактор некроза опухолей (TNF), TNF- α , TNF- β , рецептор I для TNF, рецептор II для TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, рецептор 1 для VEGF, рецептор 2 для VEGF, рецептор 3 для VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, сывороточный альбумин, vWF, амилоидные белки (например, амилоид альфа), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGF β , CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), химазу, FGF, фурин, эндотелин-1, эотаксин (например, эотаксин-1, эотаксин-2, эотаксин-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFN α , 1-309, интегрины, L-селектин, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMP, эластазу нейтрофилов, остеопонтин, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, сиглек-8, TARC, TGF β , тромбин, Tim-1, TNF, TRANCE, триптазу, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, альфа β 6, альфа β 8, cMET, CD8, vWF, амилоидные белки (например, амилоид альфа), MMP12, PDK1 и IgE. В другом варианте осуществления лигандом-мишенью является рецептор GLP-1, или его части. Например, в способе в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения лигандом может быть экстраклеточный домен рецептора GLP-1.

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения пептид или полипептид выделяют посредством пэннинга.

В одном варианте осуществления любого из способов настоящего изобретения набор подвергают воздействию лиганда (лиганда-мишени; родового лиганда) в присутствии протеазы, и один или несколько членов набора отбирают на основе связывания с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления любых способов настоящего изобретения набор включает дисплейную систему. Например, дисплейной системой может быть бактериофаговый дисплей, рибосомный дисплей, компартментализация и дисплей в эмульсиях, дисплей в дрожжах, дисплей с использованием пуромидина, бактериальный дисплей, дисплей на плазмиде или дисплей с использованием ковалентного соединения. В предпочтительных дисплейных системах функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с функциональными характеристиками пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. В конкретных вариантах осуществления дисплейная система включает реплицируемые носители генетической информации.

В некоторых вариантах осуществления любых способов настоящего изобретения дисплейная система включает бактериофаговый дисплей. Бактериофагом может быть, например, fd, M13, лямбда, MS2 или T7. В конкретных вариантах осуществления система бактериофагового дисплея является поливалентной. В некоторых вариантах осуществления пептид или полипептид представлен в виде белка слияния с рIII.

В одном варианте осуществления любых способов настоящего изобретения набор пептидов или полипептидов (например, варьируемых доменов) представлен на бактериофагах, например, при размере фаговой библиотеки, составляющем от 10^6 до 10^{15} , например от 10^8 до 10^{12} репликативных единиц (инфекционных вирионов). В одном варианте осуществления набор представлен на бактериофагах при инкубации со второй или дополнительной протеазой.

В других вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения способ, кроме того, включает амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту амплифицируют посредством увеличения численности фагов, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

В одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения набор пептидов или полипептидов представлен на бактериофагах, которые увеличивают в численности и экспрессируют в бактериальных клетках, таких как E.coli. В этом варианте осуществления набор пептидов или полипептидов подвергают воздействию бактериальной протеазы при экспрессии в бактериальных клетках.

В некоторых вариантах осуществления набором является набор единичных варьируемых доменов иммуноглобулинов. В конкретных вариантах осуществления единичным варьируемым доменом иммуноглобулина является варьируемый домен тяжелой цепи. В более конкретных вариантах осуществления варьируемым доменом тяжелой цепи является варьируемый домен тяжелой цепи человека. В других вариантах осуществления единичным варьируемым доменом иммуноглобулина является варьируемый домен легкой цепи. В конкретных вариантах осуществления варьируемым доменом легкой цепи является варьируемый домен легкой цепи человека.

В другом аспекте изобретения является способ отбора пептида или полипептида, который связывается с лигандом-мишенью с высокой аффинностью, из набора пептидов или полипептидов. Способ включает получение набора пептидов или полипептидов, объединение набора и протеазы в условиях,

подходящих для активности протеазы, и выделение пептида или полипептида, который связывается с лигандом-мишенью.

В соответствии с вышеотмеченными способами настоящего изобретения, в которых желаемой биологической активностью является активность связывания, лиганд, который связывается, (лиганд-мишень; родовой лиганд) не является таким же, как протеаза(ы).

В другом аспекте изобретением является способ создания набора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов. Способ включает получение набора пептидов или полипептидов, объединение набора пептидов или полипептидов и протеазы в условиях, подходящих для активности протеазы, и выделение множества пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, посредством чего создают набор устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления множество пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, выделяют на основе активности связывания. Например, множество пептидов или полипептидов можно выделить на основе связывания с родовым лигандом, таким как белок A, белок G или белок L.

В другом аспекте изобретением является способ отбора устойчивого к протеазе полипептида, включающего единственный вариабельный домен иммуноглобулина (dAb), который связывается с лигандом-мишенью, из набора. В одном варианте осуществления способ включает обеспечение системы фагового дисплея, включающей набор полипептидов, которые включают единичный вариабельный домен иммуноглобулина, объединение системы фагового дисплея и протеазы, выбираемой из группы, состоящей из эластазы, лейкозима и трипсина, в условиях, подходящих для активности протеазы, и выделение фага, представляющего полипептид, включающий единичный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с лигандом-мишенью. Подходяще, в одном варианте осуществления этого аспекта, когда способ, кроме того, включает инкубацию в условиях экспрессии эндогенной протеазы. Например, эндогенной протеазой является протеаза, которая экспрессируется дисплейной системой.

В некоторых вариантах осуществления протеазу используют в концентрации, составляющей 100 мкг/мл, и объединенные систему фагового дисплея и протеазу инкубируют при приблизительно 37°C в течение ночи.

В некоторых вариантах осуществления фаг, представляющий полипептид, включающий единичный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с лигандом-мишенью, выделяют посредством связывания с указанной мишенью. В других вариантах осуществления фаг, представляющий полипептид, включающий единичный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с лигандом-мишенью, выделяют с помощью пэннинга.

Настоящее изобретение также относится к выделенному, устойчивому к протеазе пептиду или полипептиду, отбираемому или отобранному с помощью описываемых здесь способов. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к агонистам рецептора GLP-1, таким как описываемые здесь пептиды GLP-1. Подходящие пептиды GLP-1 и производные пептидов GLP-1 представлены в примерах и на фиг. 1. Другие подходящие пептиды включают гомологи или производные GLP-1, такие как эксендин и его гомологи и производные. Дополнительные подходящие производные включают устойчивые к дипептидилпептидазе IV производные GLP-1. Один предпочтительный пептид определяется аминокислотной последовательностью DMS7148 (последовательностью 6 на фиг. 1). Другой предпочтительный пептид определяется аминокислотной последовательностью DMS7161 (последовательностью 11 на фиг. 1). Подходяще, когда эти пептиды GLP-1 слиты с последовательностью AlbuAbTM. В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к выделенному, устойчивому к протеазе (например, трипсину, эластазе, лейкозиму) единичному вариабельному домену иммуноглобулина (например, вариабельному домену тяжелой цепи антитела человека, вариабельному домену легкой цепи антитела человека), отбираемому или отобранному с помощью описываемых здесь способов.

Преимущественно, когда пептиды или полипептиды в соответствии с настоящим изобретением проявляют улучшенные свойства в плане экспрессии в хозяевах с низкой себестоимостью без протеолиза во время экспрессии, что делает их, тем самым, более подходящими для продукции в промышленном масштабе.

Настоящее изобретение также относится к выделенной или рекомбинантной нуклеиновой кислоте, которая кодирует устойчивый к протеазе пептид или полипептид (например, устойчивый к трипсину, эластазе или лейкозиму единичный вариабельный домен иммуноглобулина), отбираемый или отобранный с помощью описываемых здесь способов, и к векторам (например, экспрессионным векторам) и клеткам-хозяевам, которые включают нуклеиновые кислоты.

Настоящее изобретение также относится к способу получения устойчивого к протеазе пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму единичного вариабельного домена иммуноглобулина), отбираемого или отобранного с помощью описываемых здесь способов, включающему поддержание клетки-хозяина, которая содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивый к протеазе пептид или полипептид, в условиях, подходящих для экспрессии, посредством чего продуцируется устойчивый к протеазе пептид или полипептид.

Таким образом, в связи с любым аспектом настоящего изобретения протеаза может быть протеазой,

эндогенной по отношению к дисплейной системе, например, бактериальной протеазой, или обнаруживается в одной или нескольких следующих жидкостях, гомогенатах или экстрактах: сыворотке, мокроте, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярном лаваже, гомогенате ткани легкого, легочном экстракте, панкреатическом экстракте, желудочном соке, слюне или слезах. В одном варианте осуществления протеазой является протеаза, обнаруживаемая в глазу и/или слезах. Как здесь рассматривается, отобранные устойчивые к протеазам пептиды или полипептиды полезны при терапии, профилактике и диагностики заболевания или состояния у млекопитающих, например, людей. В частности, пептиды и полипептиды полезны в качестве основы для лекарственных средств, которые будут, вероятно, контактировать с протеазами после введения пациенту, такому как человек.

Например, после введения в желудочно-кишечный тракт (например, введения перорально, сублингвально, ректально), в случае которого пептид или полипептид может подвергаться воздействию протеазы в одном или нескольких отделах: верхнем отделе желудочно-кишечного тракта, нижнем отделе желудочно-кишечного тракта, ротовой полости, желудке, тонкой кишке и толстой кишке. Следовательно, в одном варианте осуществления предусматривается устойчивый к протеазе пептид или полипептид, вводимый перорально, сублингвально или ректально в желудочно-кишечный тракт пациента для осуществления лечения и/или профилактики заболевания или состояния у пациента.

Например, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пероральному введению являющегося антагонистом TNF альфа пептида или полипептида, отобранного или отбираемого с помощью способа настоящего изобретения, для лечения и/или профилактики TNF альфа-опосредованного состояния или заболевания, такого как артрит (например, ревматоидный артрит), IBD, псориаз или болезнь Крона. В этом варианте осуществления антагонистом может быть единичный вариабельный домен (dAb) иммуноглобулина против TNFR1. В другом примере пептид или полипептид будет, вероятно, встречаться с протеазой после введения (например, посредством ингаляции или интраназально) в легочную ткань (например, легкое или дыхательные пути). Следовательно, в одном варианте осуществления предусматривается устойчивый к протеазе пептид или полипептид, вводимый посредством ингаляции или интраназально в легочную ткань пациента для осуществления лечения и/или профилактики заболевания или состояния у пациента. Таким состоянием может быть астма (например, аллергическая астма), COPD, грипп или любое другое легочное заболевание или состояние, описываемое в заявке WO 2006038027 (US 2006002935), включенной сюда посредством ссылки.

В другом примере пептид или полипептид будет, вероятно, встречаться с протеазами в сыворотке после введения парентерально, например, благодаря инъекции, например, подкожно. Следовательно, в одном варианте осуществления предусматривается устойчивый к протеазам пептид или полипептид, вводимый посредством инъекции и для осуществления лечения и/или профилактики заболевания или состояния у пациента. Таким состоянием может быть диабет. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусматривается парентеральное введение агониста рецептора глюканоподобного пептида-1, такого как GLP-1 или его гомологи и производные, такие как эксендин или его производные, отобранного или отбираемого с помощью способа настоящего изобретения, для осуществления лечения и/или профилактики диабета или родственных диабету нарушений.

Пептиды и полипептиды в соответствии с настоящим изобретением могут демонстрировать повышенные или относительно высокие температуры плавления (T_m), обеспечивающие повышенную стабильность. Признаком пептидов и полипептидов может быть связывание мишени с высокой аффинностью. Эти признаки, объединенные с устойчивостью к протеазам, делают пептиды и полипептиды пригодными для применения в качестве лекарственных средств у млекопитающих, таких как люди, где будут, вероятно, встречаться протеазы, например, в случае введения в желудочно-кишечный тракт, легочную ткань или парентерального введения.

В другом примере пептид или полипептид (например, вариабельный домен или антагонист) будет, вероятно, встречаться с протеазой после введения (например, посредством инъекции внутрь глаза или в виде глазных капель) в глаз пациента. Следовательно, в одном варианте осуществления предусматривается введение устойчивого к протеазе пептида, полипептида, единичного вариабельного домена иммуноглобулина, агониста или антагониста в глаз пациента (например, человека) для осуществления лечения и/или профилактики заболевания или состояния (например, заболевания или состояния глаза) у пациента. Введение может быть местным введением в глаз, в форме глазных капель или посредством инъекции в глаз, например, в стекловидное тело глаза.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается препарат для доставки в легкое, включающий агонист, антагонист, пептид, полипептид или вариабельный домен настоящего изобретения, с пределом размера частиц, составляющим менее 5 микрон, например, менее 4,5, 4, 3,5 или 3 микрон (например, при нахождении в буфере Бриттона-Робинсона, например при pH от 6,5 до 8,0, например при pH от 7 до 7,5, например при pH 7 или при pH 7,5).

В одном варианте осуществления предоставляются препараты и композиции при pH от 6,5 до 8,0, например от 7 до 7,5, например 7, например 7,5.

Пептиды или полипептиды (например, вариабельные домены) в соответствии с любым аспектом

настоящего изобретения могут иметь T_m, составляющую по крайней мере 50°C, или по крайней мере 55°C, или по крайней мере 60°C, или по крайней мере 65°C, или по крайней мере 70°C. Агонист, антагонист, применение, способ, композиция, устройство или препарат настоящего изобретения может включать такой пептид или полипептид.

В одном аспекте настоящего изобретения пептиды, полипептиды, вариабельные домены, агонисты, антагонисты, композиции или препараты настоящего изобретения являются по существу стабильными после инкубации (в концентрации полипептида или вариабельного домена, составляющей 1 мг/мл) при 37-50°C в течение 14 дней в буфере Бриттона-Робинсона. В одном варианте осуществления по крайней мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% пептида, полипептида, агониста, антагониста или вариабельного домена остаются не подвергшимися агрегации после такой инкубации при 37°C. В одном варианте осуществления по крайней мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% пептида, полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации при 37°C. В одном варианте осуществления по крайней мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% пептида, полипептида, агониста, антагониста или вариабельного домена остаются не подвергшимися агрегации после такой инкубации при 50°C. В одном варианте осуществления по крайней мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% пептида, полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации при 50°C. В одном варианте осуществления агрегация пептидов, полипептидов, вариабельных доменов, агонистов, антагонистов не наблюдается после любой из таких инкубации. В одном варианте осуществления pI пептида, полипептида или вариабельного домена остается неизменной или по существу неизменной после инкубации при 37°C в концентрации полипептида или вариабельного домена, составляющей 1 мг/мл, в буфере Бриттона-Робинсона.

В одном аспекте настоящего изобретения пептиды, полипептиды, вариабельные домены, агонисты, антагонисты, композиции или препараты настоящего изобретения являются по существу стабильными после инкубации (в концентрации полипептида или вариабельного домена, составляющей 100 мг/мл) при 4°C в течение 7 дней в буфере Бриттона-Робинсона при pH от 7 до 7,5 (например, при pH 7 или pH 7,5). В одном варианте осуществления по крайней мере 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% пептида, полипептида, агониста, антагониста или вариабельного домена остаются не подвергшимися агрегации после такой инкубации. В одном варианте осуществления по крайней мере 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% пептида, полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации. В одном варианте осуществления агрегация пептидов, полипептидов, вариабельных доменов, агонистов, антагонистов не наблюдается после любой из таких инкубации.

В одном аспекте настоящего изобретения пептиды, полипептиды, вариабельные домены, агонисты, антагонисты, композиции или препараты настоящего изобретения являются по существу стабильными после распыления (в концентрации полипептида или вариабельного домена, составляющей 40 мг/мл), например, при комнатной температуре, 20 или 37°C, в течение 1 ч, например, в струйном распылителе, например, колпачке распылителя Pari LC+. В одном варианте осуществления по крайней мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% пептида, полипептида, агониста, антагониста или вариабельного домена остаются не подвергшимися агрегации после такого распыления. В одном варианте осуществления по крайней мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% пептида, полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такого распыления. В одном варианте осуществления агрегация пептидов, полипептидов, вариабельных доменов, агонистов, антагонистов не наблюдается после любого из таких распылений.

Пептид или полипептид может быть выделенным и/или рекомбинантным.

Подходяще, в одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения, когда устойчивый к протеазе пептид или полипептид отбирают из набора пептидов или полипептидов.

Настоящее изобретение также относится к устойчивому к протеазе пептиду или полипептиду (например, устойчивому к трипсину, эластазе или лейкозиму единичному вариабельному домену иммуноглобулина), отбираемому или отобранному с помощью описываемых здесь способов, для применения в медицине (например, для терапии или диагностики). Настоящее изобретение также относится к применению устойчивого к протеазе пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму единичного вариабельного домена иммуноглобулина), отбираемого или отобранного с помощью описываемых здесь способов, для производства лекарственного средства для лечения заболевания. Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества устойчивого к протеазе пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму единичного вариабельного домена иммуноглобулина), отбираемого или отобранного с помощью описываемых здесь способов.

В одном варианте осуществления любого аспекта настоящего изобретения способ, кроме того, включает объединение второй протеазы с набором устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов в условиях, подходящих для активности второй протеазы; и выделение по крайней мере одного пептида

или полипептида, обладающего желаемой биологической активностью, посредством чего отбирают по крайней мере один пептид или полипептид, устойчивый ко второй протеазе. Первая и вторая протеазы являются отличными. Второй протеазой может быть определенная выше протеаза. В одном варианте осуществления первая или вторая протеаза является эндогенной по отношению к системе дисплея набора.

Настоящим изобретением, кроме того, обеспечивается выделенный агонист рецептора GLP-1, включающий пептид или полипептид, устойчивый к одной или нескольким протеазам, отмеченным выше, при инкубации с протеазой в условиях, подходящих для способа настоящего изобретения, например, при условии (i) концентрации, составляющей от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 3 мг/мл протеазы, (ii) температуры, составляющей от приблизительно 20 до приблизительно 40°C, и (iii) периода времени, составляющего по крайней мере приблизительно 30 мин (например, при условии составляющей 100 мкг/мл концентрации протеазы при 37°C в течение по крайней мере 1 ч), для введения пациенту для осуществления лечения и/или профилактики диабета. Агонист может использоваться для введения посредством инъекции.

В одном варианте осуществления способов настоящего изобретения отобранный пептид или полипептид далее оценивают на устойчивость ко второй протеазе или к первой протеазе, но при наборе условий, отличающихся от таковых, использованных в способе отбора. Вторая протеаза отличается от первой протеазы, но без этого она может быть любой протеазой, описанной выше. В одном варианте осуществления в способах настоящего изобретения отбирают более чем один устойчивый к протеазе пептид или полипептид, с последующей дополнительной стадией определения, какой из этих пептидов или полипептидов демонстрирует устойчивость ко второй протеазе или к первой протеазе, но при наборе условий, отличающихся от таковых, использованных в способе отбора. Вторая протеаза отличается от первой протеазы, но без этого она может быть любой протеазой, описанной выше. Таким образом получают один или несколько пептидов или полипептидов, устойчивых к более чем одной протеазе. В одном варианте осуществления первая или вторая протеаза является протеазой, которая эндогенно экспрессируется в системе дисплея набора.

В одном варианте осуществления способов настоящего изобретения отбирают устойчивый к протеазе мономерный пептид или полипептид (например, мономер в виде единичного вариабельного домена иммуноглобулина).

Лекарственные средства, агонисты и антагонисты, настоящего изобретения могут включать константную область антитела (например, Fc), слитую с указанным пептидом или полипептидом.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается применение устойчивого к протеазе пептида или полипептида при производстве лекарственного средства для введения млекопитающему для обеспечения лекарственного средства с улучшенной фармакокинетикой. Улучшенной фармакокинетикой может быть увеличенная AUC (площадь под кривой) и/или удлиненный период полувыведения. В одном варианте осуществления устойчивый к протеазе пептид или полипептид является отобранным или отбираемым с помощью способа настоящего изобретения. В одном варианте осуществления пептидом или полипептидом является единичный вариабельный домен иммуноглобулина. Лекарственное средство может включать константную область антитела (например, Fc антитела), слитую с указанным пептидом или полипептидом.

Настоящим изобретением обеспечивается лекарственное средство, включающее устойчивый к протеазе пептид или полипептид, для введения млекопитающему (например, человеку) для обеспечения лекарственного средства с улучшенной фармакокинетикой у млекопитающего. В одном варианте осуществления устойчивый к протеазе пептид или полипептид является отобранным или отбираемым с помощью способа настоящего изобретения. В одном варианте осуществления пептидом или полипептидом является единичный вариабельный домен иммуноглобулина. Лекарственное средство может включать константную область антитела (например, Fc), слитую с указанным пептидом или полипептидом.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены последовательности вариантов 1-10 слияния GLP-1-AlbudAb.

На фиг. 2 демонстрируется гель после электрофореза вариантов 6-10 слияния GLP-1-AlbudAb.

На фиг. 3 демонстрируется гель после электрофореза вариантов 6-10 слияния GLP-1-AlbudAb (концентрированных).

На фиг. 4 демонстрируется гель после электрофореза варианта 11 слияния GLP-1-AlbudAb.

На фиг. 5 демонстрируются результаты масс-спектрометрии вариантов 6-11 слияния GLP-1-AlbudAb; на фиг. 5a) демонстрируется DMS7148 (вариант 6); (примечания к исследованию: определенная масса соответствует ожидаемой массе с одной дисульфидной связью (15245,88)); b) демонстрируется DMS7149 (вариант 7) (примечания к исследованию: определенная масса соответствует остаткам 24-142 (12860,56), 26-142 (12603,26) и 28-142 (12390,97), все с единичными дисульфидными связями. Каждый пик сопровождается пиком, который составляет +42 Да - наиболее вероятно с ацетилизацией); c) демонстрируется DMS7150 (вариант 8) (примечания к исследованию: определенная масса соответствует остаткам 26-142 с одной дисульфидной связью (12603,26)); d) демонстрируется DMS7151 (вариант 9) (примечания к исследованию: не способен составлять 12960, 12890,5, 12603 и 12391,50 приблизительно

соответствуют остаткам 24-142, 26-142 и 28-142, соответственно, каждый с одной дисульфидной связью (12862,53, 12605,24 и 12392,94). Однако существует составляющее 2 Да несоответствие по массе между определенной и рассчитанной массами); е) демонстрируется DMS7152 (вариант 10) (примечания к исследованию: 12790,5 и 12320,5 соответствуют остаткам 24-142 и 28-142, соответственно, каждый с одной дисульфидной связью (12790,42 и 12320,84); ф) демонстрируется DMS7161 (вариант 11).

На фиг. 6 представлены результаты исследования варианта 6 слияния GLP-1-AlbudAb.

На фиг. 7 представлены результаты исследования варианта 11 слияния GLP-1-AlbudAb.

Подробное описание изобретения

В рамках этого описания настоящее изобретение описано, с учетом вариантов осуществления, таким образом, которые позволяют представить ясное и точное описание. Предполагается и должно быть понятно, что варианты осуществления могут быть различным образом объединены или разделены без отхода от настоящего изобретения.

В настоящем описании "пептид" относится к приблизительно 2-приблизительно 50 аминокислотам, которые соединены вместе через посредство пептидных связей.

В настоящем описании, "полипептид" относится к по крайней мере приблизительно 50 аминокислотам, которые соединены вместе через посредство пептидных связей. Полипептиды обычно включают третичную структуру и свернуты с образованием функциональных доменов.

В настоящем описании пептид или полипептид (например, доменное антитело (dAb)), который является "устойчивым к деградации протеазой", не подвергается в значительной степени деградации протеазой при инкубации с протеазой в условиях, подходящих для активности протеазы. Полипептид (например, dAb) не подвергается в значительной степени деградации, когда не более приблизительно 25%, не более приблизительно 20%, не более приблизительно 15%, не более приблизительно 14%, не более приблизительно 13%, не более приблизительно 12%, не более приблизительно 11%, не более приблизительно 10%, не более приблизительно 9%, не более приблизительно 8%, не более приблизительно 7%, не более приблизительно 6%, не более приблизительно 5%, не более приблизительно 4%, не более приблизительно 3%, не более приблизительно 2%, не более приблизительно 1% белка подвергается деградации или белок по существу не подвергается деградации протеазой при инкубации с протеазой в течение приблизительно 1 ч при температуре, подходящей для активности протеазы, например, при 37 или 50°C. Деградацию белка можно определить, используя любой подходящий способ, например, посредством электрофореза в SDS-ПААГ или функционального анализа (например, связывания лиганда), описываемого здесь.

В настоящем описании "дисплейная система" относится к системе, в которой совокупность полипептидов или пептидов доступна для отбора, исходя из желаемой характеристики, такой как физическая, химическая или функциональная характеристика. Дисплейной системой может быть подходящий набор полипептидов или пептидов (например, в растворе, иммобилизованном на подходящей подложке). Дисплейной системой может также быть биохимическая система, в которой используется клеточная экспрессионная система (например, экспрессия библиотеки нуклеиновых кислот, например, в трансформированных, инфицированных или трансдуцированных клетках и представление кодируемых полипептидов на поверхности клеток) или бесклеточная экспрессионная система (например, компартментализация и дисплей в эмульсиях). В предпочтительных дисплейных системах функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с физическими, химическими и/или функциональными характеристиками полипептида или пептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. При использовании такой дисплейной системы можно отобразить полипептиды или пептиды, обладающие желаемой физической, химической и/или функциональной характеристикой, а нуклеиновую кислоту, кодирующую отобранный полипептид или пептид, можно легко выделить или извлечь. В данной области техники известен ряд дисплейных систем, в которых функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с физическими, химическими и/или функциональными характеристиками полипептида или пептида, например, бактериофаговый дисплей (фаговый дисплей), рибосомный дисплей, компартментализация и дисплей в эмульсиях, дисплей в дрожжах, дисплей с использованием пуромицина, бактериальный дисплей, дисплей на плазмиде, дисплей с использованием ковалентного соединения и т.п. (см., например, EP 0436597 (Dyax), патент США № 6172197 (McCafferty et al.), патент США № 6489103 (Griffiths et al.)).

В настоящем описании "набор" относится к совокупности полипептидов или пептидов, которые характеризуются разнообразием аминокислотных последовательностей. Отдельные члены набора могут обладать общими признаками, такими как общие структурные признаки (например, общая каркасная структура) и/или общие функциональные признаки (например, способность к связыванию с общим лигандом (например, родовым лигандом или лигандом-мишенью)).

В настоящем описании "функциональный" характеризует полипептид или пептид, обладающий биологической активностью, такой как активность специфического связывания. Например, термин "функциональный полипептид" включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) связывается с антигеном-мишенью благодаря своему сайту связывания антигена, и фермент, который связывает свой субстрат(ы).

В настоящем описании "родовой лиганд" относится к лиганду, который связывается со значитель-

ной частью (например, по существу всеми) функциональных членов конкретного набора. Родовой лиганд (например, общеродовой лиганд) может связываться со многими членами конкретного набора даже несмотря на то, что члены могут не обладать специфичностью связывания в отношении общего лиганда-мишени. В общем, присутствие функционального сайта связывания родового лиганда на полипептиде (на что указывает способность к связыванию родового лиганда) указывает на то, что полипептид правильно свернут и является функциональным. Соответствующие примеры родоных лигандов включают суперантигены, антитела, которые связывают эпитоп, представленный на значительной части функциональных членов набора, и т.п.

"Суперантиген" является техническим термином, который относится к родоным лигандам, которые взаимодействуют с членами суперсемейства иммуноглобулинов в сайте, который отличен от сайтов связывания лигандов-мишеней этих белков. Стафилококковые энтеротоксины являются примерами суперантигенов, которые взаимодействуют с рецепторами Т-клеток. Суперантигены, которые связываются с антителами, включают белок G, который связывается с константной областью IgG (Bjorck and Kronvall, J. Immunol., 133: 969 (1984)); белок A, который связывается с константной областью IgG и V_H-доменами (Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97: 822 (1966)); и белок L, который связывается с V_L-доменами (Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)).

В настоящем описании "лиганд-мишень" относится к лиганду, который специфически или избирательно связывается полипептидом или пептидом. Например, когда полипептидом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, лигандом-мишенью может быть любой желаемый антиген или эпитоп, а когда полипептидом является фермент, лигандом-мишенью может быть любой желаемый субстрат. Связывание с антигеном-мишенью зависит от полипептида или пептида, являющегося функциональным.

В настоящем описании "антительная форма" относится к любой подходящей полипептидной структуре, в которую можно включить вариабельный домен антитела, чтобы придать структуре специфичность связывания в отношении антигена. В данной области техники известен ряд подходящих антительных форм, таких как химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антител, гомодимеры и гетеродимеры из тяжелых цепей и/или легких цепей антител, антигенсвязывающие фрагменты любой из вышеприведенных форм (например, Fv-фрагмент (например, одноцепочечный Fv (scFv), Fv с дисульфидными связями), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент), единичный вариабельный домен антитела (например, dAb, V_H, V_{HH}, V_L, и модифицированные варианты любой из вышеприведенных форм (например, модифицированные посредством ковалентного присоединения полиэтиленгликоля или другого подходящего полимера).

Выражение "единичный вариабельный домен иммуноглобулина" относится к вариабельному домену антитела (V_H, V_{HH}, V_L), который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от других V-областей или -доменов. Единичный вариабельный домен иммуноглобулина может быть представлен в форме (например, гомо- или гетеромультимере) с другими вариабельными областями или вариабельными доменами, при этом другие области или домены не требуются для связывания антигена единичным вариабельным доменом иммуноглобулина (т.е. единичный вариабельный домен иммуноглобулина связывает антиген независимо от дополнительных вариабельных доменов). "Доменная антитело" или "dAb" является тем же, что и "единичный вариабельный домен иммуноглобулина", как этот термин используется в настоящем описании. Единичный вариабельный домен иммуноглобулина предпочтительно представляет собой вариабельный домен антитела человека, но также включает единичные вариабельные домены антител других видов, таких как грызуны (например, домены, описанные в WO 00/29004 (US 2002012909), содержание которой в целом включено сюда посредством ссылки), усатая акула-нянька и род Camelid (V_{HH} dAb). V_{HH} Camelid представляют собой полипептиды в виде единичных вариабельных доменов иммуноглобулинов, которые происходят из рода, включающего верблюда, ламу, альпаку, одногорбого верблюда и гуанако, которые продуцируют антитела в виде тяжелых цепей, лишенные приодно легких цепей.

"Домен" является свернутой белковой структурой, которая является третичной структурой, независимой от остальной части белка. Обычно домены ответственны за дискретные функциональные свойства белков и во многих случаях могут быть добавлены к другим белкам, удалены или перенесены на них без утраты функции оставшейся части белка и/или домена. "Единичный вариабельный домен антитела" представляет собой свернутый полипептидный домен, включающий последовательности, характерные для вариабельных доменов антител. Следовательно, он включает полные вариабельные домены антител и модифицированные вариабельные домены, в которых, например, один или несколько петлевых фрагментов замещены последовательностями, не являющимися характерными для вариабельных доменов антител, или вариабельные домены антител, которые были усечены или включают N- или C-концевые удлинения, а также свернутые фрагменты вариабельных доменов, которые сохраняют по крайней мере активность и специфичность связывания полноразмерного домена.

Термин "библиотека" относится к смеси гетерогенных полипептидов или нуклеиновых кислот. Библиотека состоит из членов, каждый из которых имеет единственную полипептидную или нуклеотид-

ную последовательность. В этом смысле "библиотека" является синонимом "набора". Различия по последовательности между членами библиотеки ответственны за разнообразие, присутствующее в библиотеке. Библиотека может принимать форму простой смеси полипептидов или нуклеиновых кислот или может быть в форме организмов или клеток, например, бактерий, вирусов, клеток животных или растений и т.п., трансформированных библиотекой нуклеиновых кислот.

Предпочтительно, когда каждый отдельный организм или клетка содержит лишь одну или ограниченное количество членов библиотеки. Предпочтительно, когда нуклеиновые кислоты включены в экспрессионные векторы для того, чтобы сделать возможной экспрессию полипептидов, кодируемых нуклеиновыми кислотами. Следовательно, в предпочтительном аспекте библиотека может принимать форму популяции организмов-хозяев, при этом каждый организм содержит одну или несколько копий экспрессионного вектора, содержащего один член библиотеки в форме нуклеиновой кислоты, который можно экспрессировать для продуцирования соответствующего ему члена-полипептида. Таким образом, популяция организмов-хозяев обладает возможностью кодировать большой набор разнообразных полипептидов.

"Универсальной каркасной областью" является единичная последовательность каркасной области антитела, соответствующая областям антитела, консервативным по последовательности, как определено Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, 1991), или соответствующая набору иммуноглобулинов зародышевой линии человека или их структуре, определенной Chothia и Lesk ((1987), J. Mol. Biol. 196: 910-917). В настоящем изобретении предусматривается использование одной каркасной области или набора таких каркасных областей, которая, как было установлено, позволяет получить практически любую специфичность связывания благодаря вариации лишь в гипервариабельных участках.

Совмещения аминокислотных и нуклеотидных последовательностей и гомологию, схожесть или идентичность, определяемые здесь, предпочтительно осуществляют и определяют с использованием алгоритма BLAST 2 Sequences, используя параметры по умолчанию (Tatusova, T.A. et al., FEMS Microbiol Lett, 774: 187-188 (1999)).

Настоящее изобретение относится к способу отбора устойчивых к протеазе пептидов и полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью. По крайней мере два селективных давления используются в способе для создания эффективного процесса отбора полипептидов, которые являются в высокой степени стабильными и устойчивыми к деградации протеазой, и которые обладают желаемой биологической активностью. Как здесь рассматривается, устойчивые к протеазе пептиды и полипептиды обычно сохраняют биологическую активность. В противоположность, чувствительные к протеазе пептиды и полипептиды расщепляются или гидролизуются под действием протеазы в описываемых здесь способах, а, следовательно, утрачивают свою биологическую активность. Соответственно, устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды обычно отбирают на основе их биологической активности, такой как активность связывания.

Описываемые здесь способы дают несколько преимуществ. Например, как описано и приведено в качестве примера здесь, пептиды или полипептиды, которые отбирают в отношении устойчивости к протеолитической деградации одной протеазой (например, трипсином), являются также устойчивыми к деградации другими протеазами (например, эластазой, лейкозимом). Кроме того, существует корреляция устойчивости к протеазе с более высокой температурой плавления (T_m) пептида или полипептида. Более высокие температуры плавления служат признаками более стабильных пептидов и полипептидов. Также существует корреляция устойчивости к деградации протеазой с высокой аффинностью связывания с лигандами-мишенями. Таким образом, описываемые здесь способы обеспечивают эффективный способ отбора, выделения и/или извлечения полипептидов, которые обладают желаемой биологической активностью и которые также подходят для *in vivo* терапевтических и/или диагностических применений, поскольку они являются устойчивыми к протеазам и стабильными.

Способы отбора

В одном аспекте изобретением является способ отбора, выделения и/или извлечения из библиотеки или набора пептидов и полипептидов (например, дисплейной системы) пептида или полипептида, который является устойчивым к деградации протеазой (например, одной или несколькими протеазами). Предпочтительно, когда способом является способ отбора, выделения и/или извлечения из библиотеки или набора пептидов и полипептидов (например, дисплейной системы) полипептида, который является устойчивым к деградации протеазой (например, одной или несколькими протеазами). Обычно способ включает обеспечение библиотеки или набора пептидов или полипептидов, инкубацию библиотеки или набора в присутствии протеазы (например, бактериальной протеазы или добавляемой извне протеазы, такой как трипсин, эластаза, лейкозим, панкреатин, мокрота) в условиях, подходящих для активности протеазы, и отбор, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который является устойчивым к деградации протеазой и обладает желаемой биологической активностью. Пептиды или полипептиды, которые подвергаются деградации под действием протеазы, обычно имеют уменьшенную биологическую активность или утрачивают свою биологическую активность вследствие активности протеазы. Соответственно, пептиды или полипептиды, которые являются устойчивыми к деградации протеазой, мож-

но отобрать, выделить и/или извлечь, используя способы, основанные на их биологической активности, такой как активность связывания (например, связывание с общим лигандом, связывание со специфическим лигандом, связывание с субстратом), каталитическая активность или другая биологическая активность.

Как здесь описано и приведено в качестве примера, устойчивые к протеазе dAb обычно связывают свои мишени-лиганды с высокой аффинностью. Таким образом, в другом аспекте изобретением является способ отбора, выделения и/или извлечения пептида или полипептида, который связывает лиганд, предпочтительно лиганд-мишень, с высокой аффинностью.

Предпочтительно способом является способ отбора, выделения и/или извлечения полипептида, который связывает лиганд, предпочтительно лиганд-мишень, с высокой аффинностью. Обычно способ включает обеспечение библиотеки или набора пептидов или полипептидов, объединение библиотеки или набора с протеазой (например, трипсином, эластазой, лейкозимом, панкреатином, мокротой) в условиях, подходящих для активности протеазы, и отбор, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который связывает лиганд (например, лиганд-мишень). Как здесь описано, способ может также включать инкубацию библиотеки или набора пептидов или полипептидов в условиях, подходящих для активности протеазы, которая является эндогенной по отношению к дисплейной системе, такой как бактериальная протеаза (причем дисплейная система включает экспрессию в бактериях). Поскольку библиотеку или набор подвергли воздействию протеазы в условиях, при которых чувствительные к протеазе пептиды будут подвергаться расщеплению, активность протеазы может уничтожить менее стабильные полипептиды, обладающие низкой аффинностью связывания, и, тем самым, создать совокупность пептидов или полипептидов, связывающихся с высокой аффинностью. Например, отобранный пептид или полипептид может связывать свою мишень-лиганд с аффинностью (KD ; $KD = K_{\text{диссоциации}}(kd)/K_{\text{ассоциации}}(ka)$, определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса), составляющей 1 мкМ или меньше, предпочтительно от приблизительно 500 нМ до приблизительно 0,5 пМ. Например, пептид или полипептид с высокой аффинностью может связывать лиганд-мишень с аффинностью, составляющей приблизительно 500 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 1 пМ или приблизительно 0,5 пМ. Полагают, что пептиды и полипептиды, устойчивые к протеазам, имеют меньшую энтропию и/или большую энергию стабилизации. Таким образом, корреляция между устойчивостью к протеазам и связыванием с высокой аффинностью может быть связана с компактностью и стабильностью поверхностей пептидов и полипептидов, отобранных с помощью способа настоящего изобретения.

Библиотеку или набор пептидов или полипептидов объединяют с протеазой (например, одной или несколькими протеазами) в условиях, подходящих для протеолитической активности протеазы. Условия, которые являются подходящими для протеолитической активности протеазы, и биологические препараты или смеси, содержащие протеолитическую активность, хорошо известны в данной области техники или могут быть без труда определены специалистом со средним уровнем компетентности в данной области техники. При желании, подходящие условия можно определить или оптимизировать, например, посредством определения протеазной активности в диапазоне pH-условий, концентраций протеазы, температур и/или посредством изменения периода времени, в течение которого позволяют взаимодействие библиотеки или набора с протеазой. Например, в некоторых вариантах осуществления отношение (молярное отношение) протеазы, например, трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариационному домену) является составляющим 800 к 80000 (например, 8000 к 80000) отношением протеаза:пептид или полипептид; например, при использовании 10 мкг/мл протеазы отношением является составляющее 800 к 80000 отношение протеаза:пептид или полипептид; или при использовании 100 мкг/мл протеазы отношением является составляющее 8000 к 80000 отношение протеаза:пептид или полипептид. В одном варианте осуществления отношение (весовое отношение, например, мкг/мкг) протеазы (например, трипсина) к пептиду или полипептиду (например, вариационному домену) является составляющим 1600 к 160000 (например, 16000 к 160000) отношением протеаза:пептид или полипептид; например, при использовании 10 мкг/мл протеазы отношением является составляющее 1600 к 160000 отношение протеаза:пептид или полипептид; или при использовании 100 мкг/мл протеазы отношением является составляющее 16000 к 160000 отношение протеаза:пептид или полипептид. В одном варианте осуществления протеазу используют в концентрации, составляющей по крайней мере 100 или 1000 мкг/мл, а отношение (молярное отношение) протеазы, например, трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариационному домену) является составляющим 8000 к 80000 отношением протеаза:пептид или полипептид. В одном варианте осуществления протеазу используют в концентрации, составляющей по крайней мере 10 мкг/мл, а отношение (молярное отношение) протеазы, например, трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариационному домену) является составляющим 800 к 80000 отношением протеаза:пептид или полипептид. В одном варианте осуществления отношение (весовое отношение, например, мкг/мкг) протеазы (например, трипсина) к пептиду или полипептиду (например, вариационному домену) является составляющим 1600 к 160000 отношением протеаза:пептид или полипептид, например, когда концентрация составляет 10 мкг/мл; или, когда концентрация составляет 100 мкг/мл, отношением является составляющее 16000 к 160000 отношение протеаза:пептид или полипептид. В одном варианте осуществления

концентрация (с или с') составляет по крайней мере 100 или 1000 мкг/мл протеазы. Для проверки отдельного или выделенного пептида или полипептида (например, варибельного домена иммуноглобулина), например, пептида или полипептида, который уже выделен из набора или библиотеки, протеазу можно добавить к раствору пептида или полипептида в подходящем буфере (например, PBS) для получения раствора пептида или полипептида с протеазой, такого как раствор с составляющим по крайней мере приблизительно 0,01% (весовым) (вес.%) отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,01 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,02 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,03 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,04 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,05 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,06 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,07 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,08 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,09 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,1 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,2 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,3 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,4 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,6 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,7 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,8 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 0,9 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 1 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 2 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 3 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду, с составляющим по крайней мере приблизительно 4 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду или с составляющим по крайней мере приблизительно 5 вес.% отношением протеазы к пептиду или полипептиду. Смесь можно инкубировать при температуре, подходящей для активности протеазы (например, комнатной температуре, приблизительно 37°C), и образцы можно отбирать через промежутки времени (например, через 1, 2, 3 ч и т.д.). Образцы можно исследовать на деградацию белков, используя любой подходящий способ, такой как электрофорез в SDS-ПААГ или связывание с лигандом, а результаты можно использовать для установления зависимости деградации от времени.

В описываемых здесь способах может использоваться любая желаемая протеаза или протеазы. Может использоваться, например, одна протеаза, любая желаемая комбинация различных протеаз или любой биологический препарат, биологический экстракт или биологический гомогенат, который содержит протеолитическую активность. Не является необходимым, чтобы было известным наименование используемой протеазы или протеаз. Подходящие примеры протеаз, которые могут использоваться отдельно или в любой желаемой комбинации, включают сериновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспарагиновые протеазы, тиоловые протеазы, матриксную металлопротеазу, карбоксипептидазу (например, карбоксипептидазу А, карбоксипептидазу В), трипсин, химоотрипсин, пепсин, папаин, эластазу, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназу (например, протеиназу 1, протеиназу 2, протеиназу 3), термолизин, химозин, энтеропептидазу, каспазу (например, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 9, каспазу 12, каспазу 13), кальпаин, фицин, клострипаин, актинидаин, бромелаин, сепаразу, дипептидиламинопептидазу IV и т.п. Подходящие биологические экстракты, гомогенаты и препараты, которые содержат протеолитическую активность, включают сыворотку, мокроту, слизь (например, желудочную слизь, носовую слизь, бронхиальную слизь), бронхоальвеолярный лаваж, гомогенат ткани легкого, легочный экстракт, панкреатический экстракт, желудочный сок, слюну, слезы и т.п. В одном варианте осуществления протеазой является протеаза, обнаруживаемая в глазу и/или слезах. Протеазу используют в количестве, подходящем для прохождения протеолитической деградации. Например, как здесь описано, протеаза может использоваться с использованием составляющего от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 вес.% отношения протеазы к пептиду или полипептиду. Когда протеазу объединяют с дисплейной системой, которая включает набор пептидов или полипепти-

дов, (например, системой фагового дисплея), например, протеаза может использоваться в концентрации, составляющей от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 20 мкг/мл, приблизительно 30 мкг/мл, приблизительно 40 мкг/мл, приблизительно 50 мкг/мл, приблизительно 60 мкг/мл, приблизительно 70 мкг/мл, приблизительно 80 мкг/мл, приблизительно 90 мкг/мл, приблизительно 100 мкг/мл, приблизительно 200 мкг/мл, приблизительно 300 мкг/мл, приблизительно 400 мкг/мл, приблизительно 500 мкг/мл, приблизительно 600 мкг/мл, приблизительно 700 мкг/мл, приблизительно 800 мкг/мл, приблизительно 900 мкг/мл, приблизительно 1000 мкг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл или приблизительно 3 мг/мл. Подходящие концентрации составляют от приблизительно 10 мкг/мл до 1 мг/мл, от 10 мкг/мл до 100, 90, 80, 70, 60, 50 или 40 мкг/мл, или от 10, 20, 30, 40 или 50 мкг/мл до 100, 90, 80, 70, 60 мкг/мл.

Протеазу инкубируют с совокупностью пептидов или полипептидов (библиотекой или набором) при температуре, подходящей для активности протеазы. Например, протеазу и совокупность пептидов или полипептидов можно инкубировать при температуре, составляющей от приблизительно 20 до приблизительно 40°C (например, при комнатной температуре, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C, приблизительно 25°C, приблизительно 26°C, приблизительно 27°C, приблизительно 28°C, приблизительно 29°C, приблизительно 30°C, приблизительно 31°C, приблизительно 32°C, приблизительно 33°C, приблизительно 34°C, приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39°C, приблизительно 40°C). Протеазу и совокупность пептидов или полипептидов инкубируют вместе в течение периода времени, достаточного для прохождения протеолитической деградации. Например, совокупность пептидов или полипептидов можно инкубировать вместе с протеазой в течение от приблизительно 30 мин до приблизительно 24 или приблизительно 48 ч. В некоторых примерах совокупность пептидов или полипептидов инкубируют вместе с протеазой в течение ночи или в течение по крайней мере приблизительно 30 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 1,5 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 3 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 5 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 7 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 9 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 11 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 13 ч, приблизительно 14 ч, приблизительно 15 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 17 ч, приблизительно 18 ч, приблизительно 19 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 21 ч, приблизительно 22 ч, приблизительно 23 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч или дольше.

Обычно желательно, в по крайней ранних циклах отбора (например, когда используется дисплейная система), чтобы протеаза приводила к уменьшению числа клонов, которые обладают желаемой биологической активностью, в отношении которой производят отбор, по крайней мере на один порядок величины по сравнению с отборами, которые не включают инкубацию с протеазой. В конкретных примерах количество протеазы и условия, используемые в способах, являются достаточными для уменьшения числа выделяемых клонов по крайней мере на приблизительно $\log(1)$ (в 10 раз), по крайней мере на приблизительно $\log(2)$ (в 100 раз), по крайней мере на приблизительно $\log(3)$ (в 1000 раз) или на по крайней мере приблизительно $\log(4)$ (в 10000 раз). Подходящие количества протеазы и условия инкубации, которые будут приводить к желаемому уменьшению числа выделяемых клонов, можно легко определить, используя общепринятые способы и/или предоставленное здесь руководство.

Протеазу и совокупность пептидов или полипептидов можно объединить и инкубировать, используя любой подходящий способ (например, *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*). Например, протеазу и совокупность пептидов или полипептидов можно объединить в подходящей емкости и держать в неподвижном состоянии, качать, трясти, образовывать водоворот или т.п. при температуре, подходящей для активности протеазы. При желании, протеазу и совокупность пептидов или полипептидов можно объединить в *in vivo* или *ex vivo* системе, например, посредством введения совокупности полипептидов (например, библиотеки или набора фагового дисплея) подходящему животному (например, мыши) и, после прохождения периода времени, достаточного для проявления протеазой активности, выделения совокупности пептидов или полипептидов. В другом примере через орган или ткань перфузируют совокупность полипептидов (например, библиотеку или набор фагового дисплея), и после прохождения периода времени, достаточного для проявления протеазой активности, совокупность пептидов выделяют.

После инкубации устойчивый к протеазе пептид или полипептид можно отобрать на основе желаемой биологической активности, такой как активность связывания. При желании, до отбора можно добавить ингибитор протеазы. Можно использовать любой подходящий ингибитор протеазы (или комбинацию из двух или более ингибиторов протеаз), который не будет вносить значительные помехи в способ отбора. Примеры подходящих ингибиторов протеаз включают α 1-антитрипсин, α 2-макроглобулин, амастатин, антипаин, антитромбин III, апротинин, 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторид гидроклорид (AEBSF), (4-амидинофенил)метансульфонилфторид (APMSF), бестатин, бензамидин, химостатин, 3,4-дихлоризокумарин, диизопропилфторфосфат (DIFP), E-64, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), эластатинал, лейпептин, N-этилмалеимид, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), пепстатин, 1,10-фенантролин, фосфорамидон, ингибиторы сериновых протеаз, N-тозил-L-лизин-хлорметилкетон (TLCK), Na-тозил-Phe-хлорметилкетон (TPCK) и т.п. Кроме того, в продаже имеется множество препаратов, которые содержат ингибиторы нескольких классов протеаз (например, Roche Complete Protease In-

hibitor Cocktail Tablets™ (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, США), который ингибирует хитотрипсин, термолизин, папаин, проназу, панкреатический экстракт и трипсин).

Устойчивый к протеазе пептид или полипептид можно отобрать с использованием способа отбора на желаемую биологическую активность, который позволяет отличить пептиды и полипептиды, обладающие желаемой биологической активностью, от пептидов и полипептидов, не обладающих желаемой биологической активностью, и отобрать их по сравнению с пептидами и полипептидами, не обладающими желаемой биологической активностью. Обычно пептиды или полипептиды, которые подверглись гидролизу или расщеплению протеазой, утрачивают свою биологическую активность, тогда как устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды остаются функциональными. Таким образом, подходящие анализы на биологическую активность могут использоваться для отбора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов. Например, общую связывающую функцию (например, связывание общего лиганда, связывание специфического лиганда или связывание субстрата) можно оценить, используя соответствующий анализ связывания (например, ELISA, пэннинг). Например, полипептиды, которые связывают лиганд-мишень или родовой лиганд, такой как белок А, белок L или антитело, можно отобрать, выделить и/или извлечь посредством пэннинга или с использованием подходящей аффинной матрицы. Пэннинг можно выполнить посредством добавления раствора лиганда (например, родового лиганда, лиганда-мишени) в подходящий сосуд (например, пробирку, чашку Петри) и дозирования отложения лиганда на стенки сосуда или покрытия лигандом стенок сосуда. Избыток лиганда можно смыть, и в сосуд можно добавить полипептиды (например, библиотеку фагового дисплея), и сохранять сосуд в условиях, подходящих для связывания полипептидов с иммобилизованным лигандом. Несвязанный полипептид можно смыть, и связанные полипептиды можно выделить, используя любой подходящий способ, такой как соосабливание или понижение pH, например.

При использовании системы фагового дисплея связывание можно исследовать в ELISA фагов. ELISA фагов можно выполнить в соответствии с любой подходящей процедурой. В одном примере совокупность фагов, получаемую в каждом цикле отбора, можно скринировать с помощью ELISA на связывание с выбранным лигандом-мишенью или родовым лигандом для идентификации фагов, представляющих устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды. При желании, растворимые пептиды и полипептиды можно исследовать на связывание с лигандом-мишенью или родовым лигандом, например, с помощью ELISA, используя реагенты, например, против C- или N-концевой метки (см., например, Winter et al. (1994), *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55 и приводимые там ссылки). Разнообразие отобранных фагов можно также оценить с помощью гель-электрофореза продуктов ПЦР (Marks et al. 1991, выше; Nissim et al. 1994 выше), зондирования (Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227, 116) или секвенирования векторной ДНК.

Устойчивые к протеазе пептиды и полипептиды можно также отобрать, например, на основе каталитической активности, которую можно измерить с использованием анализа каталитической активности (например, анализа протеолитической активности, фосфотрансферазного анализа, фосфогидролазного анализа, анализа полимеразной активности).

Устойчивый к протеазе пептид или полипептид (например, единственный вариабельный домен антитела) может обладать специфичностью связывания с родоым лигандом или любым требуемым лигандом-мишенью, таким как белки человека или животного, включающие цитокины, факторы роста, рецепторы цитокинов, рецепторы факторов роста, ферменты (например, протеазы), кофакторы для ферментов, ДНК-связывающие белки, липиды и углеводы. Подходящие антигены-мишени включают цитокины, факторы роста, рецепторы цитокинов, рецепторы факторов роста и другие белки, описываемые здесь. Будет понятно, что этот перечень никоим образом не является полным.

В некоторых вариантах осуществления устойчивый к протеазе пептид или полипептид связывает мишень в легочной ткани, такую как мишень, выбираемая из группы, состоящей из TNFR1, IL-1, IL-1R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-8R, IL-9, IL-9R, IL-10, IL-12 IL-12R, IL-13, IL-13Ra1, IL-13Ra2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), химазы, FGF, фурина, эндотелина-1, эотаксинов (например, эотаксина-1, эотаксина-2, эотаксина-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, I-309, интегринов, L-селектина, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMP, эластазы нейтрофилов, остеопонтина, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, сиглека-8, TARC, TGFb, тромбина, Tim-1, TNF, TRANCE, триптазы, VEGF, VLA-4, VCAM, $\alpha\beta 7$, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, альфабета6, альфабета8, cMET, CD8, vWF, амилоидных белков (например, амилоида альфа), MMP12, PDK1 и IgE.

При использовании в описываемых здесь способах дисплейной системы (например, дисплейной системы, в которой функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с функциональными характеристиками пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой) часто является предпочтительной амплификация или увеличение числа копий нуклеиновых кислот, кодирующих отобранные пептиды или полипептиды. Это обеспечивает эффективный способ получения достаточных количеств нуклеиновых кислот и/или пептидов или полипептидов для дополнительных циклов отбора с использованием

описываемых здесь способов или других подходящих способов или для приготовления дополнительных наборов (например, наборов созревания аффинности). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения включают использование дисплейной системы (например, дисплейной системы, в которой функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с функциональными характеристиками пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, такой как фаговый дисплей) и, кроме того, включают амплификацию или увеличение числа копий нуклеиновой кислоты, кодирующей отобранный пептид или полипептид. Нуклеиновые кислоты можно амплифицировать, используя любые подходящие способы, такие как увеличение численности фагов, рост клеток или полимеразная цепная реакция.

Описываемые здесь способы могут использоваться в качестве части программы для выделения устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов, которая может включать, если требуется, другие подходящие способы отбора. В этих ситуациях описываемые здесь способы могут использоваться в любом желаемом месте в программе, например, до или после использования других способов отбора. Описываемые здесь способы могут также использоваться для обеспечения двух или более циклов отбора, как описано и приведено в качестве примера здесь.

В другом аспекте изобретением является способ создания набора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов. Способ включает обеспечение набора пептидов или полипептидов, объединение набора пептидов или полипептидов и протеазы в условиях, подходящих для активности протеазы, и выделение множества пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, посредством чего создают набор устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов.

Предпочтительно множество пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, выделяют на основе активности связывания, такой как связывание с родовым лигандом или лигандом-мишенью. Протеазы, дисплейные системы, условия, подходящие для активности протеазы, и способы отбора пептидов или полипептидов, которые подходят для использования в способе, описаны здесь в отношении других способов настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления используется дисплейная система (например, дисплейная система, в которой функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с функциональными характеристиками пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой), которая включает набор пептидов или полипептидов, и способ, кроме того, включает амплификацию или увеличение числа копий нуклеиновых кислот, кодирующих множество отобранных пептидов или полипептидов. Нуклеиновые кислоты можно амплифицировать, используя любой подходящий способ, такой как увеличение численности фагов, рост клеток или полимеразная цепная реакция. В одном варианте осуществления дисплейной системой является бактериофаговый дисплей, а амплификацию осуществляют через посредство экспрессии в *E.coli*. В этом варианте осуществления экспрессия протеазы в *E.coli* может обеспечить протеазу для отбора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов.

В конкретном варианте изобретением является способ создания набора устойчивых к протеазе полипептидов, включающих dAb. Способ включает обеспечение набора полипептидов, включающих dAb, объединение набора полипептидов и протеазы (например, трипсина, эластазы, лейкозима) в условиях, подходящих для активности протеазы, и выделение множества включающих dAb полипептидов, обладающих желаемой специфичностью связывания с родовым лигандом (например, белком А, белком G, белком L) или лигандом-мишенью. Способ может использоваться для создания интактного набора или набора, который смещен в сторону желаемой специфичности связывания, такого как набор созревания аффинности, на основе родительского dAb, обладающего специфичностью связывания с желаемым лигандом-мишенью.

Системы дисплея полипептидов.

Предпочтительно, когда набор или библиотека пептидов или полипептидов, обеспечиваемая для использования в способах настоящего изобретения, включает подходящую дисплейную систему. Дисплейная система предпочтительно не поддается деградации протеазой (например, одной протеазой или комбинацией протеаз и любым биологическим экстрактом, гомогенатом или препаратом, который содержит протеолитическую активность (например, сывороткой, мокротой, слизью (например, желудочной слизью, носовой слизью, бронхиальной слизью), бронхоальвеолярным лаважом, гомогенатом ткани легкого, легочным экстрактом, панкреатическим экстрактом, желудочным соком, слюной, слезами и т.п.). Предпочтительно дисплейная система и связь между дисплейной системой и представляемым полипептидом являются, по крайней мере, настолько же устойчивыми к протеазе, как и большинство стабильных пептидов или полипептидов набора. Это делает возможным легкое выделение и/или амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей отобранный представленный полипептид.

В одном примере устойчивый к протеазе пептид или полипептид можно отобрать, выделить и/или извлечь из набора пептидов или полипептидов, который находится в растворе или ковалентно или нековалентно прикреплен к подходящей поверхности, такой как пластмасса или стекло (например, титрационный микропланшет, ранжированный ряд полипептидов, такой как микрочип). Можно использовать, например, ряд пептидов, ранжированный на поверхности таким способом, что каждый отличный член библиотеки (например, уникальная пептидная последовательность) помещен в отдельной, предопреде-

ленной позиции в чипе. Наименование каждого члена библиотеки в таком чипе можно установить по его пространственной позиции в чипе. Могут быть определены позиции в чипе, в которых имеют место взаимодействия при связывании между лигандом-мишенью, например, и реагирующими членами библиотеки, идентифицируя, тем самым, последовательности реагирующих членов на основе пространственной позиции (см., например, патент США № 5143854, WO 90/15070 и WO 92/10092).

Предпочтительно, когда в способах используется дисплейная система, в которой функция кодирования нуклеиновой кислоты связана с физическими, химическими и/или функциональными характеристиками полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Такая дисплейная система может включать множество реплицируемых носителей генетической информации, таких как бактериофаг или клетки (бактерии). Предпочтительно, когда дисплейная система включает библиотеку, такую как библиотека бактериофагового дисплея. Бактериофаговый дисплей является особенно предпочтительной дисплейной системой.

Ряд подходящих систем бактериофагового дисплея (например, одновалентная дисплейная система или поливалентные дисплейные системы (см., например, Griffiths et al., патент США № 6555313 B1 (включенный сюда посредством ссылки); Johnson et al., патент США № 5733743 (включенный сюда посредством ссылки); McCafferty et al., патент США № 5969108 (включенный сюда посредством ссылки); Mulligan-Kehoe, патент США № 5702892 (включенный сюда посредством ссылки); Winter, G. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994); Soumilion, P. et al., *Appl Biochem. Biotechnol* 47(2-3): 175-189 (1994); Castagnoli, L. et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 4(2): 121-133 (2001)). Пептиды или полипептиды, представляемые в системе бактериофагового дисплея, могут быть представлены на любом подходящем бактериофаге, таком как нитевидный бактериофаг (например, fd, M13, F1), литический фаг (например, T4, T7, лямбда) или РНК-содержащий фаг (например, MS2), например.

Как правило, создают или обеспечивают библиотеку фагов, которые представляют набор пептидов или фаговых полипептидов в виде белков, слитых с подходящим белком оболочки фага (например, белком рIII fd). В гибридном белке пептиды или полипептиды могут быть представлены на конце белка оболочки фага или, если желательно, во внутренней позиции. Например, представляемый пептид или полипептид может находиться в положении, которое является аминоконцевым относительно домена 1 рIII. (Домен 1 рIII также называют N1.) Представляемый полипептид может быть непосредственно слит с рIII (например, с N-концом домена 1 рIII) или слит с рIII с использованием линкера. Если желательно, слияние может дополнительно включать метку (например, мус-эпитоп, His-метку). Библиотеки, включающие набор пептидов или полипептидов, которые представлены в виде белков, слитых с белком оболочки фага, можно создать, используя любые подходящие способы, такие как введение библиотеки фаговых векторов или фagemидных векторов, кодирующих представляемые пептиды или полипептиды, в подходящие бактерии-хозяева и культивирование результирующих бактерий для продуцирования фагов (например, используя подходящий фаг-помощник или комплементирующую плазмиду, если требуется). Подходяще, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда выбирают условия, подходящие для экспрессии протеазы в бактериях. Библиотеку фагов можно выделить из культуры, используя любой подходящий способ, такой как преципитация и центрифугирование.

Дисплейная система может включать набор пептидов или полипептидов, который имеет любую желаемую степень разнообразия. Например, набор может содержать пептиды или полипептиды, которые имеют аминокислотные последовательности, соответствующие природным полипептидам, экспрессируемым организмом, группой организмов, желаемой тканью или желаемым типом клеток, или может содержать пептиды или полипептиды, которые имеют выбранные наугад или рандомизированные аминокислотные последовательности. Если желательно, полипептиды могут иметь общий остов или каркас. Например, все полипептиды в наборе или библиотеке могут основываться на каркасе, выбираемом из белка А, белка L, белка G, домена фибронектина, антикалина, CTLA4, желаемого фермента (например, полимеразы, целлюлазы) или полипептида из суперсемейства иммуноглобулинов, такого как антитело или фрагмент антитела (например, вариабельный домен антитела). Полипептиды в таком наборе или библиотеке могут включать определенные области выбранной наугад или рандомизированной аминокислотной последовательности и области общей аминокислотной последовательности. В определенных вариантах осуществления все или по существу все полипептиды в наборе являются полипептидами желаемого типа, такого как желаемый фермент (например, полимеразы) или желаемый антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, V_H человека или V_L человека). В предпочтительных вариантах осуществления система дисплея полипептидов включает набор полипептидов, в котором каждый полипептид включает вариабельный домен антитела. Например, каждый полипептид в наборе может содержать V_H, V_L или Fv (например, одноцепочечный Fv). Как здесь описывается, набором может быть библиотека полипептидов, основанная на родительских молекулах, таких как GLP-1 или его производные, такие как устойчивое к дипептидилпептидазе IV производное.

Разнообразие по аминокислотной последовательности можно внести в любую желаемую область пептида или полипептида или каркас, используя подходящий способ. Например, разнообразие по аминокислотной последовательности можно внести в область-мишень, такую как определяющий комплементарность участок вариабельного домена антитела или гидрофобный домен, посредством создания библи-

лиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих разнообразные полипептиды, используя любой подходящий способ мутагенеза (например, ПЦР с низкой точностью воспроизведения, мутагенез с использованием олигонуклеотидов или сайт-направленный мутагенез, внесение разнообразия с использованием кодонов NNK) или любой другой подходящий способ. При желании, область полипептида, в которую вносят разнообразие, можно подвергнуть рандомизации.

Размер полипептидов, составляющих в итоге набор, является, в основном, предметом выбора, и одинаковый размер полипептидов не требуется. Предпочтительно, когда полипептиды имеют по крайней мере третичную структуру (образуют по крайней мере домен).

Отбор/выделение/извлечение.

Устойчивый к протеазе пептид или полипептид (например, совокупность устойчивых к протеазе полипептидов) можно отобрать, выделить и/или извлечь из набора или библиотеки (например, в дисплейной системе), используя любой подходящий способ. Предпочтительно устойчивый к протеазе полипептид отбирают или выделяют на основе селективируемой характеристики (например, физической характеристики, химической характеристики, функциональной характеристики). Подходящие селективируемые функциональные характеристики включают биологические активности пептидов или полипептидов в наборе, например, связывание с родovým лигандом (например, суперантигеном), связывание с лигандом-мишенью (например, антигеном, эпитопом, веществом), связывание с антителом (например, благодаря эпитопу, представленному на пептиде или полипептиде), и каталитическую активность (см., например, Tomlinson et al., WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655).

В некоторых вариантах осуществления устойчивый к протеазе пептид или полипептид отбирают и/или выделяют из библиотеки или набора пептидов или полипептидов, в которой по существу все устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды имеют общий селективируемый признак. Например, устойчивый к протеазе пептид или полипептид можно отобрать из библиотек или набора, в которой по существу все устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды связываются с общеродовым лигандом, связываются с общим лигандом-мишенью, связывают общее антитело (или связываются им) или обладают общей каталитической активностью. Этот тип отбора особенно полезен для создания набора устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов, которые основываются на родительском пептиде или полипептиде, обладающем желаемой биологической активностью, например, при проведении созревания аффинности единичного варибельного домена иммуноглобулина.

Отбор на основе связывания с общеродовым лигандом может дать набор или совокупность пептидов или полипептидов, который содержит все или по существу все из устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов, которые были компонентами исходной библиотеки или набора. Например, пептиды или полипептиды, которые связывают лиганд-мишень или родовой лиганд, такой как белок А, белок L или антитело, можно отобрать, выделить и/или извлечь посредством пэннинга или с использованием подходящей аффинной матрицы. Пэннинг можно выполнить посредством добавления раствора лиганда (например, родového лиганда, лиганда-мишени) в подходящий сосуд (например, пробирку, чашку Петри) и дозирования отложения лиганда на стенки сосуда или покрытия лигандом стенок сосуда. Избыток лиганда можно смыть, и в сосуд можно добавить пептиды или полипептиды (например, набор, который был проинкубирован с протеазой), и сохранять сосуд в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов с иммобилизованным лигандом. Несвязанные пептиды или полипептиды можно смыть, и связанные пептиды или полипептиды можно выделить, используя любой подходящий способ, такой как соскабливание или понижение pH, например.

Подходящие созданные с использованием лиганда аффинные матрицы обычно содержат твердую подложку или частицу (например, агарозу), к которой ковалентно или нековалентно прикрепляют лиганд. Аффинную матрицу можно объединить с пептидами или полипептидами (например, набором, который был проинкубирован с протеазой), используя замесный способ, колоночный способ или любой другой подходящий способ, в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов с лигандом на матрице. Пептиды или полипептиды, которые не связываются с аффинной матрицей, можно смыть, а связанные пептиды или полипептиды можно подвергнуть элюированию и выделить с использованием любого подходящего способа, такого как элюирование буфером с более низким pH, с помощью слабого денатурирующего агента (например, мочевины) или с помощью пептида, конкурирующего за связывание с лигандом. В одном примере биотинилированный лиганд-мишень объединяют с набором в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов в наборе с лигандом-мишенью. Связанные пептиды или полипептиды выделяют, используя иммобилизованный авидин или стрептавидин (например, на частице).

В некоторых вариантах осуществления родovým лигандом или лигандом-мишенью является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В качестве родových лигандов особенно полезны антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают структурные характеристики пептидов или полипептидов, являющиеся в значительной степени консервативными у пептидов или полипептидов библиотеки или набора. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, подходящие для применения в качестве лигандов для выделения, отбора и/или извлечения устойчивых к протеазе пептидов или полипептидов, могут быть моноклональными или поликлональными и могут быть приготовлены с использо-

ванием любого подходящего способа.

Библиотеки/наборы

В других аспектах настоящее изобретение относится к наборам устойчивых к протеазе пептидов и полипептидов, к библиотекам, кодирующим устойчивые к протеазе пептиды и полипептиды, и к способам создания таких библиотек и наборов.

Библиотеки, которые кодируют и/или содержат устойчивые к протеазе пептиды и полипептиды, можно приготовить или получить, используя любой подходящий способ. Библиотеку настоящего изобретения можно сконструировать так, чтобы она кодировала устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды, на основе представляющего интерес пептида или полипептида (например, пептида или полипептида, выбранного из библиотеки) или можно выбрать из другой библиотеки, используя описываемые здесь способы. Например, обогащенную в отношении устойчивых к протеазе полипептидов библиотеку можно приготовить, используя подходящую систему дисплея полипептидов.

В одном примере библиотеку фагового дисплея, включающую набор представляемых полипептидов, включающих единичные вариабельные домены иммуноглобулинов (например, V_H , V_K , V_L), объединяют с протеазой в условиях, подходящих для активности протеазы, как здесь описано. Устойчивые к протеазе полипептиды выделяют на основе желаемой биологической активности, такой как активность связывания (например, связывание с родovým лигандом, связывание с лигандом-мишенью), создавая, тем самым, библиотеку фагового дисплея, обогащенную устойчивыми к протеазе полипептидами.

В другом примере библиотеку фагового дисплея, включающую набор представляемых полипептидов, включающих единичные вариабельные домены иммуноглобулинов (например, V_H , V_K , V_L), сначала подвергают скринингу для идентификации членов набора, обладающих специфичностью связывания с желаемым антигеном-мишенью. Совокупность полипептидов, обладающих желаемой специфичностью связывания, выделяют, и совокупность объединяют с протеазой в условиях, подходящих для протеолитической активности, как здесь описано. Совокупность устойчивых к протеазе полипептидов, обладающих желаемой специфичностью связывания в отношении мишени, выделяют, создавая библиотеку, обогащенную устойчивыми к протеазе полипептидами с высокой аффинностью. Как здесь описывается, существует корреляция устойчивости к протеазе в этом способе отбора со связыванием с высокой аффинностью.

Библиотеки, которые кодируют набор полипептидов желаемого типа, можно легко создать, используя любой подходящий способ. Можно получить, например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид желаемого типа (например, полимеразу, вариабельный домен иммуноглобулина), и можно приготовить совокупность нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит одну или несколько мутаций, например, посредством амплификации нуклеиновой кислоты, используя систему допускающей ошибки полимеразной цепной реакции (ПЦР), посредством химического мутагенеза (Deng et al., J. Biol. Chem., 269:9533 (1994)) или с использованием бактериальных штаммов-мутаторов (Low et al., J. Mol. Biol., 260:359 (1996)).

В других вариантах осуществления конкретные области нуклеиновой кислоты можно сделать мишенями для внесения разнообразия. Способы мутирования выбранных положений также хорошо известны в данной области техники и включают, например, использование олигонуклеотидов с ошибочным спариванием или вырожденных олигонуклеотидов, с использованием ПЦР или без такого использования. Например, была создана библиотека синтетических антител посредством задания мутаций в антигенсвязывающих петлевых участках. Случайные или полуслучайные области H3 и L3 антител были присоединены к сегментам генов V иммуноглобулинов зародышевой линии для создания больших библиотек с не мутированными каркасными областями (Hoogenboom and Winter (1992), выше; Nissim et al. (1994), выше; Griffiths et al. (1994), выше; DeKruif et al. (1995), выше). Такое внесение разнообразия было расширено для включения некоторых или всех из других антигенсвязывающих петлевых участков (Cramer et al. (1996), Nature Med., 2:100; Riechmann et al. (1995), Bio/Technology, 13:475; Morphosys, WO 97/08320, выше). В других вариантах осуществления конкретные области нуклеиновой кислоты можно сделать мишенями для внесения разнообразия посредством, например, стратегии двустадийной ПЦР, в которой продукт первой ПЦР используется в качестве "мега-прайма" (см., например, Landt, O. et al., Gene 96:125-128 (1990)). Целевое внесение разнообразия можно также осуществить посредством, например, ПЦР со сплайсингом перекрытием удлинения (см., например, Horton, R.M. et al., Gene 77:61-68 (1989)).

Разнообразие по последовательности в выбранных положениях можно достичь с помощью изменения кодирующей последовательности, которая задает последовательность полипептида, так что ряд возможных аминокислот (например, все 20 или их подмножество) можно включить в это положение. Используя номенклатуру IUPAC, самым универсальным кодоном является NNK, который кодирует все аминокислоты, а также стоп-кодон TAG. Кодон NNK предпочтительно используют для внесения требуемого разнообразия. Также используются другие кодоны, с помощью которых добиваются того же, включающие кодоны NNN, которые приводят к созданию дополнительных стоп-кодонов TGA и TAA. Такой целевой подход может сделать возможным исследование всей области последовательности в целевой

области.

Предпочтительные библиотеки включают устойчивые к протеазе полипептиды, которые являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (например, антителами или их частями). Например, библиотеки могут включать устойчивые к протеазе полипептиды-антитела, имеющие известную конформацию основной цепи (см., например, Tomlinson et al., WO 99/20749). Библиотеки можно приготовить в подходящей плазмиде или векторе. В настоящем описании, вектор относится к дискретному элементу, который используется для введения гетерологичной ДНК в клетки для ее экспрессии и/или репликации. Может использоваться любой подходящий вектор, в том числе плазмиды (например, бактериальные плазмиды), вирусные векторы и бактериофаги, искусственные хромосомы и эписомные векторы. Такие векторы могут использоваться для простого клонирования и мутагенеза, или могут использоваться экспрессионные векторы для управления экспрессией библиотеки. Векторы и плазмиды обычно содержат один или несколько сайтов клонирования (например, полилинкер), начало репликации и по крайней мере один ген селектируемого маркера. Экспрессионные векторы могут, кроме того, содержать элементы для управления транскрипцией и трансляцией полипептида, такие как энхансерный элемент, промотор, сигнал терминации транскрипции, сигнальные последовательности и т.п. Эти элементы могут быть расположены так, чтобы быть функционально связанными с клонированной вставкой, кодирующей полипептид, так что полипептид экспрессируется и продуцируется, когда такой экспрессионный вектор сохраняют в условиях, подходящих для экспрессии (например, в подходящей клетке-хозяине).

Векторы для клонирования и экспрессии обычно содержат последовательности нуклеиновых кислот, которые обеспечивают возможность репликации вектора в одной или нескольких клетках-хозяевах. Обычно в векторах для клонирования этой последовательностью является последовательность, которая обеспечивает возможность репликации вектора независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Начало репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, начало репликации из плазмиды размером 2 микрон подходит для дрожжей, а начала репликации из различных вирусов (например, SV40, аденовируса) применимы для векторов для клонирования в клетках млекопитающих. Как правило, начало репликации не требуется для векторов для экспрессии в клетках млекопитающих, если только эти векторы не используются в клетках млекопитающих, способных к репликации ДНК на высоких уровнях, таких как клетки COS.

Векторы для клонирования или экспрессии могут содержать селективный ген, также называемый селектируемым маркером. Такие маркерные гены кодируют белок, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращиваемых в селективной культуральной среде. Поэтому клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим селективный ген, не будут выживать в культуральной среде. Типичные селективные гены кодируют белки, придающие резистентность к антибиотикам и другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, восполняют ауксотрофные недостатки или поставляют важные питательные вещества, которых нет в средах для роста.

Подходящие экспрессионные векторы могут содержать ряд компонентов, например, начало репликации, ген селектируемого маркера, один или несколько контролирующих экспрессию элементов, таких как контролирующий транскрипцию элемент (например, промотор, энхансер, терминатор) и/или один или несколько сигналов трансляции, сигнальную последовательность или лидерную последовательность и т.п. Контролирующие экспрессию элементы и сигнальная или лидерная последовательность, если присутствует, могут обеспечиваться вектором или другим источником. Для управления экспрессией могут использоваться, например, контролирующие транскрипцию и/или трансляцию последовательности клонированной нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь антитела.

Для экспрессии в желаемой клетке-хозяине может обеспечиваться промотор. Промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными. Например, промотор может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело, цепь антитела или его часть, так что он управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты. В наличии имеется ряд промоторов, подходящих для прокариотических хозяев (например, β -лактамазная и лактозная промоторные системы, промотор гена щелочной фосфатазы, триптофановая (trp) промоторная система, промоторы lac, tac, T3, T7 для E.coli) и эукариотических хозяев (например, ранний или поздний промотор вакуолизирующего обезьяньего вируса, промотор - длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса, цитомегаловирусный промотор, аденовирусный поздний промотор, промотор EG-1a).

Кроме того, экспрессионные векторы обычно включают селектируемый маркер для отбора клеток-хозяев, несущих вектор, а в случае реплицируемого экспрессионного вектора начало репликации. Гены, кодирующие продукты, придающие резистентность к антибиотикам и лекарственным средствам, являются общепринятыми селектируемыми маркерами и могут использоваться в прокариотических клетках (например, ген β -лактамазы (для резистентности к ампициллину), ген Tet для резистентности к тетрациклину) и эукариотических клетках (например, гены резистентности к неомицину (G418 или генетицину),

gpt (микофеноловой кислоте), ампициллину или гигромицину). Маркерные гены дигидрофолатредуктазы делают возможным отбор с использованием метотрексата в ряде хозяев. Гены, кодирующие продукт генов - ауксотрофных маркеров хозяина (например, LEU2, URA3, HIS3), часто используются в качестве селективируемых маркеров в дрожжах. Также предусматривается использование вирусных векторов (например, бакуловируса) или фагов и векторов, которые способны к интеграции в геном клетки-хозяина, таких как ретровирусные векторы.

Экспрессионные векторы, подходящие для экспрессии в прокариотических клетках (например, бактериальных клетках, таких как *E.coli*) или клетках млекопитающих, включают, например, вектор pET (например, pET-12a, pET-36, pET-37, pET-39, pET-40, Novagen и другие), вектор-фаг (например, pCANTAB 5 E, Pharmacia), pRIT2T (вектор для слияния с белком A, Pharmacia), pCDM8, pCDNA1.1/amp, pCDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)) и т.п. В наличии имеются экспрессионные векторы, которые подходят для применения в различных экспрессионных хозяевах, таких как прокариотические клетки (*E.coli*), клетки насекомых (клетки Schneider S2 *Drosophila*, Sf9), дрожжи (*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, клетки COS).

Предпочтительными векторами являются экспрессионные векторы, которые создают возможность для экспрессии нуклеотидной последовательности, соответствующей полипептидному члену библиотеки. Таким образом, отбор с использованием родových лигандов и/или лигандов-мишеней можно выполнить посредством отдельного размножения и экспрессии единичного клона, экспрессирующего полипептидный член библиотеки. Как здесь описано, предпочтительной дисплейной системой для отбора является бактериофаговый дисплей. Таким образом, могут использоваться фаговые или фagemидные векторы.

Предпочтительными векторами являются фagemидные векторы, которые имеют начало репликации из *E.coli* (для репликации двухцепочечной ДНК), а также начало репликации из фага (для продукции одноцепочечной ДНК). Манипулирование такими векторами и их экспрессия хорошо известны в данной области техники (Hoogenboom and Winter (1992) выше; Nissim et al. (1994), выше). Вкратце, вектор может содержать ген β -лактамазы для придания фagemиде селективности и промотор *lac*, находящийся в направлении 5' от экспрессионной кассеты, которая содержит подходящую лидерную последовательность, сайт множественного клонирования, одну или несколько пептидных меток, один или несколько стоп-кодонов TAG и фаговый белок pIII. Поэтому при использовании супрессорных и несупрессорных штаммов *E.coli* и добавления глюкозы, изопропилтио- β -D-галактозида (IPTG) или фага-помощника, такого как VCS M13, вектор способен к репликации в виде плазмиды без экспрессии, к продукции только больших количеств полипептидного члена библиотеки или продуктов-фагов, некоторые из которых содержат по крайней мере одну копию полипептида, слитого с pIII, на своей поверхности.

Библиотеки и наборы настоящего изобретения могут содержать антигенные формы. Например, полипептид, содержащийся в библиотеках и наборах, может представлять собой цельные антитела или их фрагменты, такие как Fab-, F(ab')₂-, Fv- или scFv-фрагменты, отдельные V_H- или V_L-домены, любые из которых являются либо модифицированными, либо немодифицированными. scFv-фрагменты, а также другие антигенные полипептиды, можно без труда создать, используя любой подходящий способ. В данной области техники хорошо известен ряд подходящих способов конструирования антител. Например, scFv может быть образован посредством соединения нуклеиновых кислот, кодирующих два переменных домена, с подходящим олигонуклеотидом, кодирующим подходящий линкерный пептид, такой как (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ или другие подходящие линкерные пептиды. Линкер соединяет C-конец первой V-области с N-концом второй V-области. Могут использоваться схожие методы конструирования других антигенных форм, таких как Fv-, Fab- и F(ab')₂-фрагменты. Для задания формы в виде Fab- и F(ab')₂-фрагментов полипептиды V_H и V_L можно объединить с сегментами константных областей, которые можно выделить из реаранжированных генов, C-генов зародышевой линии или синтезировать на основе данных о последовательностях антител. Библиотека или набор в соответствии с настоящим изобретением может быть библиотекой или набором V_H или V_L.

Полипептиды, включающие устойчивый к протеазе переменный домен, предпочтительно включают сайт связывания лиганда-мишени и/или сайт связывания родового лиганда. В определенных вариантах осуществления сайтом связывания родового лиганда является сайт связывания суперантигена, такого как белок A, белок L или белок G. Переменные домены могут основываться на любом желаемом переменном домене, например, V_H человека (например, V_H 1a, V_H 1b, V_H 2, V_H 3, V_H 4, V_H 5, V_H 6), V_L человека (например, V_LI, V_LII, V_LIII, V_LIV, V_LV, V_LVI или V_Lk1) или V_k человека (например, V_k2, V_k3, V_k4, V_k5, V_H6, V_k7, V_k8, V_k9 или V_k10).

Нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и способы продуцирования устойчивых к протеазе полипептидов

Настоящее изобретение также относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим устойчивые к протеазе пептиды или полипептиды, например, отбираемые или отобранные с помощью описываемых здесь способов.

Нуклеиновые кислоты, называемые здесь "выделенными", представляют собой нуклеиновые кислоты, которые были отделены от других материалов (например, других нуклеиновых кислот, таких как геномная ДНК, кДНК и/или РНК) в их первоначальном окружении (например, в клетках или в смеси нуклеиновых кислот, такой как библиотека). Выделенная нуклеиновая кислота может быть выделена как часть вектора (например, плазмиды).

Нуклеиновые кислоты, называемые здесь "рекомбинантными", представляют собой нуклеиновые кислоты, которые были созданы с помощью методологии рекомбинантных ДНК, включающей способы, которые основаны на искусственной рекомбинации, такие как клонирование в вектор или хромосому, используя, например, рестрикционные ферменты, гомологичную рекомбинацию, вирусы и т.п., и нуклеиновые кислоты, приготовленные с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной клетке-хозяину, которая включает (одну или более) рекомбинантную нуклеиновую кислоту или экспрессионную конструкцию, включающую нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивый к протеазе пептид или полипептид, например, пептид или полипептид, отбираемый или отобранный с помощью описываемых здесь способов. Настоящее изобретение также включает способ приготовления устойчивого к протеазе пептида или полипептида, включающий сохранение рекомбинантной клетки-хозяина настоящего изобретения в условиях, подходящих для экспрессии устойчивого к протеазе пептида или полипептида. Способ может дополнительно включать стадию выделения или извлечения устойчивого к протеазе пептида или полипептида, если желательно.

Например, молекулу нуклеиновой кислоты (т.е. одну или несколько молекул нуклеиновых кислот), кодирующую устойчивый к протеазе пептид или полипептид, или экспрессионный вектор (т.е. одну или несколько конструкций), включающий такую нуклеиновую кислоту(ы), можно ввести в подходящую клетку-хозяина для создания рекомбинантной клетки-хозяина, используя любой способ, подходящий для выбранной клетки-хозяина (например, трансформацию, трансфекцию, электропорацию, инфицирование), из условия, чтобы молекула(ы) нуклеиновой кислоты была функционально связана с одним или несколькими контролирующими экспрессию элементами (например, в векторе, в конструкции, созданной процессами в клетке, после интеграции в геном клетки-хозяина). Результирующую рекомбинантную клетку-хозяина можно сохранять в подходящих для экспрессии условиях (например, в присутствии индуктора, в подходящем животном, в подходящих культуральных средах, дополненных соответствующими солями, факторами роста, антибиотиками, пищевыми добавками и т.д.), посредством чего продуцируют кодируемый пептид или полипептид. Если желательно, кодируемый пептид или полипептид можно выделить или извлечь (например, из животного, клетки-хозяина, среды, молока). Этот процесс охватывает экспрессию в клетке-хозяине трансгенного животного (см., например, WO 92/03918, GenPharm International).

Устойчивый к протеазе пептид или полипептид, отобранный с помощью описываемого здесь способа, можно также продуцировать в подходящей *in vitro* экспрессионной системе, посредством химического синтеза или посредством любого другого подходящего способа.

Полипептиды, dAb, агонисты и антагонисты

Как здесь описано и приведено в качестве примера, устойчивые к протеазе полипептиды, пептиды или dAb настоящего изобретения обычно связывают свою мишень-лиганд с высокой аффинностью. Следовательно, в другом аспекте обеспечивается способ отбора, выделения и/или извлечения полипептида или dAb настоящего изобретения, который связывает антиген-мишень с высокой аффинностью. Как правило, способ включает обеспечение библиотеки или набора пептидов или полипептидов (например, dAb), объединение библиотеки или набора с протеазой (например, трипсином, эластазой, лейкозимом, панкреатином, мокротой) в условиях, подходящих для активности протеазы, и отбор, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который связывает лиганд (например, лиганд-мишень). Поскольку библиотеку или набор подвергли воздействию протеазы в условиях, при которых чувствительные к протеазе пептиды или полипептиды будут подвергаться расщеплению, активность протеазы может уничтожить менее стабильные полипептиды, обладающие низкой аффинностью связывания, и, тем самым, создать совокупность пептидов или полипептидов, связывающихся с высокой аффинностью. Например, полипептид или dAb настоящего изобретения может связывать антиген-мишень с аффинностью (K_D ; $K_D = K_{\text{диссоциации}}(kd)/K_{\text{ассоциации}}(ka)$, определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса), составляющей 1 мкМ или меньше, или от приблизительно 500 нМ до приблизительно 0,5 пМ. Например, полипептид или dAb настоящего изобретения может связывать антиген-мишень (например, TNFR1) с аффинностью, составляющей приблизительно 500 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 1 пМ или приблизительно 0,5 пМ. Хотя авторы настоящего изобретения не ограничиваются какой-либо конкретной теорией, пептиды и полипептиды, устойчивые к протеазам, как полагают, имеют

меньшую энтропия и/или большую энергию стабилизации. Таким образом, корреляция между устойчивостью к протеазам и связыванием с высокой аффинностью может быть связана с компактностью и стабильностью поверхностей пептидов, и полипептидов, и dAb, отобранных с помощью описываемого здесь способа.

Полипептид, dAb, агонист или антагонист можно экспрессировать в *E.coli* или в видах *Pichia* (например, *P. pastoris*). В одном варианте осуществления лиганд или мономер dAb секретируется в количествах, составляющих по крайней мере приблизительно 0,5 мг/л, при экспрессии в *E.coli* или в видах *Pichia* (например, *P. pastoris*). Хотя лиганды и мономеры dAb, описываемые здесь, могут быть секретиремыми при экспрессии в *E.coli* или в видах *Pichia* (например, *P. pastoris*), их можно продуцировать, используя любой подходящий способ, такой как синтетические химические способы или способы биологической продукции, в которых не используются *E.coli* или виды *Pichia*.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, dAb, агонист или антагонист не включает вариабельный домен иммуноглобулина Camelid или одну или несколько аминокислот каркасных областей, являющихся уникальными в вариабельных доменах иммуноглобулинов, кодируемых сегментами генов антител зародышевой линии Camelid, например, в положениях 108, 37, 44, 45 и/или 47.

Агонисты или антагонисты в соответствии с настоящим изобретением могут быть одновалентными или поливалентными. В некоторых вариантах осуществления агонист или антагонист является одновалентным и содержит один сайт связывания, который взаимодействует с антигеном-мишенью, сайт связывания, обеспечиваемый полипептидом или dAb настоящего изобретения. Одновалентные агонисты или антагонисты связывают один антиген-мишень и могут не вызвать сшивание или образование скопления антигена-мишени (например, рецепторных антигенов) на поверхности клеток, что может привести к активации рецептора и передаче сигнала.

В других вариантах осуществления агонист или антагонист является поливалентным. Поливалентные агонисты или антагонисты могут содержать две или более копий конкретного сайта связывания антигена-мишени или содержать два или более различных сайтов связывания, с которыми связывается антиген-мишень, при этом по крайней мере один из сайтов связывания обеспечивается полипептидом или dAb настоящего изобретения. Например, как здесь описано, агонист или антагонист может быть димером, тримером или мультимером, включающим две или более копий конкретного полипептида или dAb настоящего изобретения, который связывает антиген-мишень, или два или более различных полипептидов или dAb настоящего изобретения, которые связывают антиген-мишень. В одном варианте осуществления поливалентный антагонист связывается с рецепторным антигеном на клеточной поверхности и по существу не проявляет агонистическое в отношении антигена действие (не действует в качестве агониста антигена) в стандартном клеточном анализе.

В определенных вариантах осуществления поливалентный агонист или антагонист содержит два или более сайтов связывания желаемого эпитопа или домена антигена-мишени.

В других вариантах осуществления полипептид может быть инсулинотропным средством, таким как происходящий из GLP-1 пептид. Подходящие способы определения активности инсулинотропного средства, устойчивости к протеазам, таким как DPP-IV, периода полувыведения после введения и *in vivo* эффектов описаны, например, в WO 2006/059106.

В других вариантах осуществления поливалентный агонист или антагонист содержит два или более сайтов связывания, обеспечиваемых полипептидами или dAb настоящего изобретения, которые связываются с различными эпитопами или доменами антигена-мишени.

В определенных вариантах осуществления полипептид, dAb, агонист или антагонист настоящего изобретения эффективен в моделях хронических воспалительных заболеваниях при введении эффективного количества. Обычно эффективное количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг (например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг). Модели хронического воспалительного заболевания (см. те, которые описаны в WO 2006038027) признаны квалифицированными в данной области техники специалистами прогнозными в отношении терапевтической эффективности у людей.

Обычно лиганды настоящего изобретения (например, агонисты, антагонисты) будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически соответствующими носителями. Как правило, эти носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, любые из которых включают солевой раствор и/или буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор натрия хлорида, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и натрия хлорида с лактатом Рингера. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные средства, в случае необходимости сохранения полипептидного комплекса в суспензии, можно выбрать из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Носители для внутривенного введения включают жидкость и пищевые добавки, и электролитные добавки, такие как те, которые основаны на растворе декстрозы Рингера. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразую-

щие агенты и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition). Может использоваться ряд подходящих препаратов, в том числе препараты пролонгированного действия.

Лиганды (например, антагонисты) настоящего изобретения могут использоваться в виде отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими агентами. Они могут включать различные иммунотерапевтические средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "смеси" различных цитотоксических или других агентов в сочетании с лигандами настоящего изобретения, или даже комбинации лигандов в соответствии с настоящим изобретением, обладающих различными специфичностями, таких как лиганды, отобранные с использованием различных антигенов- или эпитопов-мишеней, независимо от того объединяют ли их перед введением.

Путем введения фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из путей, обычно известных специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники. В случае терапии, включающей без ограничения иммунотерапию, отобранные лиганды настоящего изобретения могут вводиться любому пациенту в соответствии со стандартными методами.

Введение может осуществляться любым подходящим способом, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, чрескожно, путем введения в легкие, или также, подходяще, посредством прямой инфузии с использованием катетера. Доза и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны приниматься во внимание практикующим врачом. Назначение может быть местным (например, локальной доставкой в легкое посредством легочного введения, например, интраназального введения) или системным, как предписывают условия.

Лиганды этого изобретения могут быть подвергнуты лиофилизации для хранения и воссозданы в подходящем носителе перед использованием. Было установлено, что этот метод является эффективным при использовании обычных иммуноглобулинов, и могут использоваться известные в данной области техники методы лиофилизации и воссоздания. Квалифицированным в данной области техники специалистам будет понятно, что лиофилизация и воссоздание могут привести к переменным степеням утраты активности антител (например, при использовании обычных иммуноглобулинов антитела изотипа IgM имеют тенденцию к утрате большей степени активности, чем антитела изотипа IgG), и возможно, что уровни использования должны быть увеличены для компенсации.

Композиции, содержащие лиганды настоящего изобретения (например, агонисты, антагонисты) или их смесь, могут вводиться в случае профилактических и/или терапевтических лечений. При определенных терапевтических применениях количество, достаточное для осуществления по крайней мере частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения популяции выбранных клеток, или некоторого другого измеряемого параметра, определяют как "терапевтически эффективная доза". Количества, необходимые для получения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно колеблются от 0,005 до 5,0 мг лиганда, например, dAb, агониста или антагониста, на килограмм веса тела, при этом дозы, составляющие от 0,05 до 2,0 мг/кг/дозу, являющиеся наиболее часто используемыми. В случае профилактических применений композиции, содержащие лиганды настоящего изобретения или их смесь, могут также вводиться в подобных или слегка более низких дозах для предупреждения, ингибирования или отсрочки начала заболевания (например, для поддержания ремиссии или латентности, или для предотвращения острой фазы). Квалифицированный лечащий врач сможет определить соответствующий интервал доз для лечения, подавления или профилактики заболевания. Лечение или терапию, выполненное с использованием описываемых здесь композиций, считают "эффективным, если ослабевает один или несколько симптомов (например, на по крайней мере 10% или на по крайней мере одну позицию на шкале клинической оценки), относительно таких симптомов, имеющих до лечения, и относительно таких симптомов у индивидуума (человека или животного-модели), не подвергнутого лечению такой композицией, или другого подходящего контроля. Очевидно, что симптомы будут меняться в зависимости от целевого заболевания или нарушения, но они могут быть определены лечащим врачом или специалистом со средним уровнем компетентности. Такие симптомы можно определить, например, посредством контролирования уровня одного или нескольких биохимических показателей заболевания или нарушения (например, уровней фермента или метаболита, между которым и заболеванием существует корреляция, количеств пораженных клеток и т.д.), посредством контролирования физических проявлений (например, воспаления, размера опухоли и т.д.) или по принятой шкале клинической оценки, например, расширенной шкале инвалидности (в случае рассеянного склероза), опросному в отношении воспалительного заболевания кишечника бланку для офицеров полиции (при оценке по 32 позициям определяется качество жизни относительно функционировании кишечника, системных симптомов, социальной функции и эмоционального состояния - оценка колеблется от 32 до 224, при этом более высокие оценки означают лучшее качество жизни), шкале качества жизни при ревматоидном артрите или другой принятой шкале клинической оценки, известной в этой области. Длительное (например, в течение одного дня или более, или дольше) ослабление симптомов заболевания или нарушения на по крайней мере 10% или на по крайней мере одну или несколько позиций по конкретной клинической шкале служит признаком "эффективного" лечения. Так же профи-

лактика, выполненная с использованием описываемой здесь композиции, является "эффективной", если начало или тяжесть одного или нескольких симптомов отсрочивается, уменьшается или отменяется относительно таких симптомов у подобного индивидуума (человека или модели на животном), не подвергнутого лечению композицией.

Композиция, содержащая лиганд (например, агонист, антагонист) или их смесь в соответствии с настоящим изобретением, может использоваться в профилактических и терапевтических ситуациях для помощи в изменении, инактивации, уничтожении или удалении популяции выбранных клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, отобранные наборы полипептидов, описываемые здесь, могут использоваться вне организма или *in vitro* избирательно для уничтожения, истощения или иным образом эффективного удаления совокупности клеток-мишеней из гетерогенной совокупности клеток. Кровь от млекопитающего можно объединить вне организма с лигандами, посредством чего нежелательные клетки уничтожаются или иначе удаляются из крови, возвращаемой млекопитающему в соответствии со стандартными методами.

Композиция, содержащая лиганд (например, агонист или антагонист) в соответствии с настоящим изобретением, может использоваться в профилактических и терапевтических ситуациях для помощи в изменении, инактивации, уничтожении или удалении популяции выбранных клеток-мишеней у млекопитающего.

Лиганды (например, направленные против антигена-мишени антагонисты, агонисты, мономеры dAb) можно вводить и/или составлять вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими или активными агентами. Когда лиганд (например, dAb) вводят с дополнительным терапевтическим агентом, лиганд может вводиться до, одновременно или после введения дополнительного агента. Обычно лиганд и дополнительный агент вводят так, что обеспечивается перекрытие терапевтического эффекта.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции, содержащие лекарственное средство - GLP-1 или аналог или производное GLP-1 в соответствии с настоящим изобретением, могут вводиться парентерально нуждающимся в таком лечении пациентам. Парентеральное введение может выполняться посредством подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца вроде ручки. Альтернативно, парентеральное введение может выполняться с помощью инфузионного насоса. Дополнительной опцией является композиция, которая может быть порошком или жидкостью в форме аэрозоля для введения лекарственного средства GLP-1 или аналога или производного GLP-1 в нос или легкие. В качестве все еще дополнительной опции, лекарственное средство GLP-1 или аналог или производное GLP-1 настоящего изобретения может также вводиться чрескожно, например, из пластыря, необязательно пластыря для ионтофореза, или через слизистые оболочки, например, трансбуккально. В других вариантах осуществления композиции вводят перорально, например, в виде пилюли, капсулы, напитка (например, продаваемого как напиток для потери веса в случае лечения ожирения).

Композицию для парентерального введения соединений GLP-1 можно, например, приготовить, как описано в WO 03/002136 (US2003119734) (включенной сюда посредством ссылки).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению соединения в соответствии с настоящим изобретением для приготовления лекарственного средства для лечения гипергликемии, сахарного диабета типа 1, сахарного диабета типа 2 или недостатка β -клеток. В конкретных вариантах осуществления в случае этих показаний лекарственное средство выбирают из инсулино-тропного средства, инкретина, глюканоподобного пептида 1, пептида GLP-1, аналога GLP-1, производного GLP-1, PYY, пептида PYY, аналога PYY, производного PYY, эксендина-3, пептида эксендина-3, аналога эксендина-3, производного эксендина-3, эксендина-4, пептида эксендина-4, аналога эксендина-4, производного эксендина-4 или комбинации из двух или более этих средств (например, пептида GLP-1 и пептида PYY).

Лечение соединением в соответствии с настоящим изобретением может также быть скомбинировано со вторым или несколькими фармакологически активными веществами, которые могут быть или могут не быть частью конъюгата и слияния лекарственного средства. Например, активный агент выбирают из противодиабетических средств, средств против ожирения, регулирующих аппетит средств, антигипертензивных средств, средств для лечения и/или предупреждения осложнений, являющихся следствием диабета или связанных с ним, и средств для лечения и/или предупреждения осложнений и нарушений, являющихся следствием ожирения или связанных с ним. В контексте настоящего изобретения выражение "противодиабетическое средство" включает соединения для лечения и/или профилактики инсулинорезистентности и заболеваний, при которых инсулинорезистентность является патофизиологическим механизмом.

Формы

Удлиненный период полувыведения полезен при *in vivo* применениях иммуноглобулинов, особенно антител и в особенности фрагментов антител небольшого размера. Такие фрагменты (Fv, Fv с дисульфидными связями, Fab, scFv, dAb) подвергаются быстрому выведению из организма; поэтому, хотя они способны быстро достигать большей части частей тела, и быстро продуцируются, и с ними легче обращаться, их *in vivo* применения ограничивались их лишь недолгим сохранением *in vivo*. Один вариант настоящего изобретения решает эту проблему посредством обеспечения удлиненного периода полувыведения лигандов *in vivo* и, следовательно, более длительных периодов времени сохранения в организме функциональной активности лиганда.

Способы фармакокинетического анализа и определения периода полувыведения лигандов будут хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам. Детали можно найти в Kenneth, A et al.: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* и в Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Также дается ссылка на документ "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, опубликованный Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), в котором описываются фармакокинетические параметры, такие как периоды полувыведения t_{α} и t_{β} и площадь под кривой (AUC).

Периоды полувыведения ($t_{1/2}$ альфа и $t_{1/2}$ бета) и AUC можно определить, исходя из кривой зависимости концентрации лиганда в сыворотке от времени. Пакет аналитических программ WinNonlin (доступный от Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, США) можно использовать, например, для моделирования кривой. На первой фазе (альфа-фаза) лиганд подвергается, главным образом, распределению у пациента, с некоторой степенью элиминации. Вторая фаза (бета-фаза) является конечной фазой, когда лиганд уже распределен, и концентрация в сыворотке снижается по мере выведения лиганда из пациента. Период полувыведения t_{α} представляет собой период полувыведения первой фазы, а период полувыведения t_{β} представляет собой период полувыведения второй фазы. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается лиганд или композиция, включающая лиганд в соответствии с настоящим изобретением, имеющий(ая) период полувыведения t_{α} в пределах 15 мин или больше. В одном варианте осуществления нижний предел составляет 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. Дополнительно или альтернативно, лиганд или композиция в соответствии с настоящим изобретением будет иметь период полувыведения t_{α} в пределах вплоть до и включительно 12 ч. В одном варианте осуществления верхний предел составляет 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 ч. Примером подходящих пределов являются пределы от 1 до 6 ч, от 2 до 5 ч или от 3 до 4 ч.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается лиганд (полипептид, dAb, агонист или антагонист) или композиция, включающая лиганд в соответствии с настоящим изобретением, имеющий(ая) период полувыведения t_{β} в пределах 2,5 ч или больше. В одном варианте осуществления нижний предел составляет 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. Дополнительно или альтернативно, лиганд или композиция в соответствии с настоящим изобретением имеет период полувыведения t_{β} в пределах вплоть до и включительно 21 дней. В одном варианте осуществления верхний предел составляет 12, 24 ч, 2 дня, 3, 5, 10, 15 или 20 дней. В одном варианте осуществления лиганд или композиция в соответствии с настоящим изобретением будет иметь период полувыведения t_{β} в пределах от 12 до 60 ч. В дополнительном варианте осуществления пределы будут составлять от 12 до 48 ч. Во все еще дополнительном варианте осуществления пределы будут составлять от 12 до 26 ч.

Дополнительно или альтернативно вышеприведенным критериям, настоящим изобретением обеспечивается лиганд или композиция, включающая лиганд в соответствии с настоящим изобретением, имеющий(ая) значение AUC (площади под кривой) в пределах 1 мг·мин/мл или больше. В одном варианте осуществления нижний предел составляет 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 или 300 мг·мин/мл. Дополнительно или альтернативно, лиганд или композиция в соответствии с настоящим изобретением имеет AUC в пределах вплоть до 600 мг·мин/мл. В одном варианте осуществления верхний предел составляет 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 или 50 мг·мин/мл. В одном варианте осуществления лиганд в соответствии с настоящим изобретением будет иметь AUC в пределах, выбираемых из группы, состоящих из следующих пределов: от 15 до 150 мг·мин/мл, от 15 до 100 мг·мин/мл, от 15 до 75 мг·мин/мл и от 15 до 50 мг·мин/мл.

Полипептиды и dAb настоящего изобретения и включающие их агонисты или антагонисты могут быть заданы в такой форме, которая имеет больший гидродинамический размер, например, посредством присоединения группы ПЭГ, сывороточного альбумина, трансферрина, рецептора трансферрина или, по крайней мере, его части, связывающей трансферрин, Fc-области антитела, или посредством конъюгации с доменом антитела. Например, полипептиды, dAb, агонисты и антагонисты задают в форме большего антигенсвязывающего фрагмента антитела или в форме антитела (например, задают в форме Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

Гидродинамический размер лигандов (например, мономеров и мультимеров dAb) настоящего изобретения можно определить, используя хорошо известные в данной области техники способы. Для определения гидродинамического размера лиганда может использоваться, например, гель-фильтрация. Под-

ходящие матрицы для гель-фильтрации для определения гидродинамических размеров лигандов, такие как поперечно сшитые агарозные матрицы, широко известны и легко доступны.

Размер формы лиганда (например, размер составляющей ПЭГ, присоединенной к мономеру dAb) может меняться в зависимости от желаемого применения. Например, если лиганд, как предполагается, покидает кровоток и входит в периферические ткани, желательным является сохранение гидродинамического размера низким для способствования выходу из кровотока. Альтернативно, если желательно, чтобы лиганд оставался в системном кровотоке в течение более длительного периода времени, размер лиганда можно увеличить, например, посредством задания формы Ig-подобного белка.

Удлинение периода полувыведения посредством нацеливания на антиген или эпитоп, которое удлиняет период полувыведения *in vivo*.

Гидродинамический размер лиганда и период его полувыведения в сыворотке можно также увеличить посредством конъюгации или связи связывающего антиген-мишень полипептида, dAb, агониста или антагониста по настоящему изобретению со связывающим доменом (например, антителом или фрагментом антитела), связывающим антиген или эпитоп, который удлиняет период полувыведения *in vivo*, как здесь описывается. Например, связывающий антиген-мишень агент (например, полипептид) можно конъюгировать или связать с антителом против сывороточного альбумина или против неонатального Fc-рецептора или фрагментом антитела, например, направленным против SA или неонатального Fc-рецептора dAb, Fab, Fab' или scFv, или с молекулой Affibody против SA или молекулой Affibody против неонатального Fc-рецептора, или авимером против SA, или связывающим доменом молекулы против SA, который включает остов, выбираемый, но предпочтительно без ограничения, из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, SpA, молекулы Affibody, авимера, GroE1 и фибронектина (см. заявку РСТ/GB2008/000453, поданную 8 февраля 2008 г. (WO 2008096158; US 2009259026) ради описания этих связывающих доменов, которые, а также их последовательности включены сюда посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения). Конъюгация относится к композиции, включающей полипептид, dAb, агонист или антагонист настоящего изобретения, который связан (ковалентно или нековалентно) со связывающим доменом, который связывает сывороточный альбумин.

Подходящие полипептиды, которые удлиняют период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, включают, например, гибридные белки специфичный для рецептора трансферрина лиганд-нейрофармацевтический агент (см. патент США № 5977307, идеи которого включены сюда посредством ссылки), рецептор эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, трансферрин, рецептор трансферрина (например, растворимый рецептор трансферрина), инсулин, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF 1), рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF 2), рецептор инсулина, фактор X системы свертывания крови, α 1-антитрипсин и HNF 1 α . Подходящие полипептиды, которые удлиняют период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, также включают альфа-1 гликопротеин (оросомукоид; AAG), альфа-1 антихимотрипсин (ACT), альфа-1 микроглобулин (белок HC; AIM), антитромбин III (AT III), аполипопротеин A-1 (Apo A-1), аполипопротеин B (Apo B), церулоплазмин (Cp), компонент C3 комплемента (C3), компонент C4 комплемента (C4), ингибитор C1 эстеразы (C1-INH), C-реактивный белок (CRP), ферритин (FER), гемопексин (HPX), липопротеин(а) (Lp(a)), связывающий маннозу белок (MBP), миоглобин (Myo), преальбумин (транстиретин; PAL), ретинолсвязывающий белок (RBP) и ревматоидный фактор (RF).

Подходящие белки экстраклеточного матрикса включают, например, коллагены, ламинины, интегрины и фибронектин. Коллагены являются основными белками экстраклеточного матрикса. В настоящее время известно приблизительно 15 типов молекул коллагенов, обнаруживаемых в различных частях тела, например, коллаген типа I (составляющий 90% коллагена тела), обнаруживаемый в кости, коже, сухожилии, связках, роговице, внутренних органах, или коллаген типа II, обнаруживаемый в хряще, межпозвоночных дисках, хорде и стекловидном теле глаза.

Подходящие белки крови включают, например, белки плазмы (например, фибрин, α -2 макроглобулин, сывороточный альбумин, фибриноген (например, фибриноген А, фибриноген В), сывороточный амилоидный белок А, гаптоглобин, профилин, убихитин, утероглобулин и β -2-микроглобулин), ферменты и ингибиторы ферментов (например, плазминоген, лизоцим, цистатин С, альфа-1-антитрипсин и ингибитор трипсина поджелудочной железы), белки иммунной системы, такие как белки иммуноглобулины (например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, легкие цепи (каппа/лямбда) иммуноглобулинов), транспортные белки (например, ретинолсвязывающий белок, α -1 микроглобулин), дефенсины (например, бета-дефенсин 1, дефенсин 1 нейтрофилов, дефенсин 2 нейтрофилов и дефенсин 3 нейтрофилов) и т.п.

Подходящие белки, обнаруживаемые в гематознцефалическом барьере или в нервной ткани, включают, например, рецептор меланокортина, миелин, переносчик аскорбата и т.п.

Подходящие полипептиды, которые удлиняют период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, также включают белки, находящиеся в почке (например, полицистин, коллаген типа IV, переносчик K1 органических ионов, антиген Хеймана), белки, находящиеся в печени (например, алкогольдегидрогеназу, G250), белки, находящиеся в легком (например, секреторный компонент, который связывает IgA), белки, находящиеся в сердце (например, HSP 27, который связан с дилатационной кардиомиопатией), белки,

находящиеся в коже (например, кератин), специфичные для кости белки, такие как морфогенетические белки (BMP), которые являются подмножеством суперсемейства белков - трансформирующих факторов роста β , которые демонстрируют остеогенную активность (например, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), опухолевоспецифичные белки (например, трофобластный антиген, рецептор герцептина, рецептор эстрогенов, катепсины (например, катепсин В, который можно обнаружить в печени и селезенке)).

Подходящие специфичные в отношении заболеваний белки включают, например, антигены, представленные только на активированных Т-клетках, включающие LAG-3 (ген активации лимфоцитов), лиганд остеопротегерина (OPGL; см. Nature 402, 304-309 (1999)), OX40 (член семейства рецепторов TNF, который представлен на активированных Т-клетках, и экспрессия которого специфически увеличивается в клетках, продуцирующих вирус Т-клеточного лейкоза человека типа I (HTLV-I); см. Immunol. 165(1):263-70 (2000)). Подходящие специфичные в отношении заболеваний белки также включают, например, металлопротеазы (связанные с артритом/раками), включающие CG6512 Drosophila, паралиггин человека, FtsH человека, AFG3L2 человека, ftsH мыши; и ангиогенные факторы роста, включающие кислотный фактор роста фибробластов (FGF-1), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), фактор роста сосудистого эндотелия/фактор сосудистой проницаемости (VEGF/VPF), трансформирующий фактор- α роста (TGF α), фактор-альфа некроза опухолей (TNF- α), ангиогенин, интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PD-ECGF), плацентарный фактор роста (PlGF), мидкин, тромбоцитарный фактор-BB роста (PDGF) и фрактактин.

Подходящие полипептиды, которые удлиняют период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, также включают стресс-белки, такие как белки теплового шока (HSP). HSP обычно обнаруживаются внутри клеток. При их внеклеточном обнаружении это является индикатором того, что клетка погибла и выбросила свое содержимое. Эта не запрограммированная гибель клеток (некроз) происходит в результате травмы, заболевания или повреждения, экстраклеточные HSP запускают ответ иммунной системы. Связывание экстраклеточного HSP может привести к локализации композиций настоящего изобретения в очаге заболевания.

Подходящие белки, вовлеченные в перенос Fc, включают, например, рецептор Брамбелла (также известный как FcRB). Этот рецептор Fc имеет две функции, обе из которых потенциально применимы для доставки. Функциями являются (1) перенос IgG от матери ребенку через плаценту, (2) защита IgG от деградации, посредством чего удлиняется его период полувыведения в сыворотке. Полагают, что рецептор возвращает IgG в оборот из эндосом (см. Holliger et al., Nat Biotechnol 15(7):632-6 (1997)).

dAb, которые связывают сывороточный альбумин (AlbuAbTM).

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается полипептид, агонист или антагонист (например, лиганд с двойной специфичностью, включающий направленный против антигена-мишени dAb (первый dAb), который связывается с антигеном-мишенью, и второй dAb, который связывается с сывороточным альбумином (SA), при этом второй dAb связывается с SA с определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса K_D , составляющей от 1 нМ до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 или 500 мкМ (т.е. $\times 10^{-9}$ - 5×10^{-4}), или от 100 нМ до 10 мкМ, или от 1 до 5 мкМ, или от 3 до 70 нМ, или от 10 нМ до 1, 2, 3, 4 или 5 мкМ, например, от 30 до 70 нМ, определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном варианте осуществления первый dAb (или мономер dAb) связывается с SA (например, HSA) с определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса K_D , составляющей приблизительно 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 нМ или 1, 2 или 3 мкМ. В одном варианте осуществления в случае лиганда с двойной специфичностью, включающего первый направленный против SA dAb и второй dAb к антигену-мишени, аффинность (например, K_D и/или $K_{диссоциации}$, определяемая с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием BiaCore) второго dAb в отношении своей мишени превышает в 1-100000 раз (например, 100-100000, или 1000-100000, или 10000-100000 раз) аффинность первого dAb в отношении SA. В одном варианте осуществления сывороточным альбумином является сывороточный альбумин человека (HSA). Например, первый dAb связывается с SA с аффинностью, составляющей приблизительно 10 мкМ, в то время как второй dAb связывает мишень с аффинностью, составляющей 100 пМ. В одном варианте осуществления сывороточным альбумином является сывороточный альбумин человека (HSA). В одном варианте осуществления первый dAb связывается с SA (например, HSA) с K_D , составляющей приблизительно 50, например 70, 100, 150 или 200 нМ. Детали в отношении лигандов с двойной специфичностью представлены в WO 03002609, WO 04003019 и WO 04058821.

В одном варианте осуществления лиганды настоящего изобретения могут включать dAb, который связывается с сывороточным альбумином (SA) с определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса K_D , составляющей от 1 нМ до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 или 500 мкМ (т.е. $\times 10^{-9}$ - 5×10^{-4}), или от 100 нМ до 10 мкМ, или от 1 до 5 мкМ, или от 3 до 70 нМ, или от 10 нМ до 1, 2, 3, 4 или 5 мкМ. Например, от 30 до 70 нМ, определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном варианте осуществления первый dAb (или мономер dAb) связывается с SA (например, HSA) с определяемой с помощью поверхностного плазмонного резонанса K_D , составляющей при-

близительно 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 нМ или 1, 2 или 3 мкМ. В одном варианте осуществления первый и второй dAb связаны с помощью линкера, например линкера длиной от 1 до 4 аминокислот или от 1 до 3 аминокислот, или более 3 аминокислот, или более 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 аминокислот. В одном варианте осуществления более длинный линкер (длиной, составляющей более 3 аминокислот) используется для усиления активности (K_D одного или обоих dAb в агонисте или антагонисте). В одном варианте осуществления линкером является линкер со спиральной структурой.

В конкретных вариантах осуществления лигандов, агонистов и антагонистов dAb связывается с сывороточным альбумином человека и конкурирует за связывание с альбумином с dAb, выбираемым из группы, состоящей из MSA-16, MSA-26 (см. WO 04003019 (US 2006106203) ради раскрытия этих последовательностей, которые, а также соответствующие им нуклеиновые кислоты, включены сюда посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения),

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474),
DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3
(SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO:
479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481),
DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4
(SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:
486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489),
DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25
(SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID
NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496),
DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15
(SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID
NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503),
DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22
(SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID
NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510),
DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29
(SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID
NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517)

(см. WO 2007080392 (US20070003549) ради раскрытия этих последовательностей, которые, а также соответствующие им нуклеиновые кислоты, включены сюда посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения; SEQ ID NO в этом абзаце являются SEQ ID NO, которые присутствуют в WO 2007080392),

dAb8 (dAb10), dAb 10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAb 4, 7, 41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb16 (dAb21, dAb7m16), dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dAb41, dAb46 (dAb 47, 52 и 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5), dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7h10), dAb7h11 (DOM7h11), dAb7h12 (DOM7h12), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1) и dAb7p2 (DOM7p2)

(см. WO 2008096158 (US 2009259026) ради раскрытия этих последовательностей, которые, а также соответствующие им нуклеиновые кислоты, включены сюда посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения). Альтернативные названия представлены в скобках после dAb, например, dAb8 имеет альтернативное название dAb10, т.е. dAb8 (dAb10).

В определенных вариантах осуществления dAb связывается с сывороточным альбумином человека и включает аминокислотную последовательность, которая идентична по крайней мере на приблизительно 80%, или по крайней мере на приблизительно 85%, или по крайней мере на приблизительно 90%, или по крайней мере на приблизительно 95%, или по крайней мере на приблизительно 96%, или по крайней мере на приблизительно 97%, или по крайней мере на приблизительно 98%, или по крайней мере на приблизительно 99% аминокислотной последовательности dAb, выбираемого из группы, состоящей из

MSA-16, MSA-26,

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474),
DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3
(SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO:
479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481),
DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4
(SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:
486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489),
DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25
(SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID
NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496),
DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15
(SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID
NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503),
DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22
(SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID
NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510),
DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29
(SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID
NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517)
(SEQ ID No в этом абзаце являются SEQ ID No, которые
присутствуют в WO2007080392 (US20070003549)),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23,
dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30,
dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24,
Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7,
dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21,
dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33,
dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54,
dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3,
dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15,
dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6,
dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13,
dAb7h14, dAb7p1 и dAb7p2.

Например, dAb, который связывается с сывороточным альбумином человека, может включать аминокислотную последовательность, которая идентична по крайней мере на приблизительно 90%, или по крайней мере на приблизительно 95%, или по крайней мере на приблизительно 96%, или по крайней мере на приблизительно 97%, или по крайней мере на приблизительно 98%, или по крайней мере на приблизительно 99% по аминокислотной последовательности

DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482),
 DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6
 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:
 487), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497),
 DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23
 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID
 NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494),
 DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495) (SEQ ID No в этом абзаце являются SEQ
 ID No, которые присутствуют в WO2007080392 (US20070003549)),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24,
 Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7,
 dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21,
 dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33,
 dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54,
 dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9,
 dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 и dAb7h14.

В определенных вариантах осуществления dAb связывается с сывороточным альбумином человека и включает аминокислотную последовательность, которая идентична по крайней мере на приблизительно 80%, или по крайней мере на приблизительно 85%, или по крайней мере на приблизительно 90%, или по крайней мере на приблизительно 95%, или по крайней мере на приблизительно 96%, или по крайней мере на приблизительно 97%, или по крайней мере на приблизительно 98%, или по крайней мере на приблизительно 99% аминокислотной последовательности dAb, выбираемого из группы, состоящей из

DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-
 1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-8 (SEQ ID
 NO: 496), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490),
 DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26
 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID
 NO: 495) (SEQ ID No в этом абзаце являются SEQ ID No, которые
 присутствуют в WO2007080392 (US20070003549)),

dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26,
 dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41,
 dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10,
 dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 и dAb7h14.

В более конкретных вариантах осуществления dAb представляет собой dAb-VK, который связывается с сывороточным альбумином человека и имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-
 1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-8 (SEQ ID
 NO: 496) (SEQ ID No в этом абзаце являются SEQ ID No, которые
 присутствуют в WO2007080392 (US20070003549)),

dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb54, dAb7h1, dAb7h2,
 dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12,
 dAb7h13 и dAb7h14.

В более конкретных вариантах осуществления dAb представляет собой dAb-V_h, который связывается с сывороточным альбумином человека и имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из dAb7h30 и dAb7h31.

В более конкретных вариантах осуществления dAb представляет собой dAb7h11 или dAb7h14.

В других вариантах осуществления dAb, лиганд, агонист или антагонист связывается с сывороточным альбумином человека и включает один, два или три CDR любой из вышеприведенных аминокислотных последовательностей, например, один, два или три CDR dAb7h11 или dAb7h14.

Подходящие V_h Camelid, которые связываются с сывороточным альбумином человека, включают

те, которые описаны в WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) (US2009238829) и в WO 2007080392 (US20070003549) (последовательности V_{HH} и соответствующие им нуклеиновые кислоты включены сюда посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения), такие как последовательность A (SEQ ID NO: 518), последовательность B (SEQ ID NO: 519), последовательность C (SEQ ID NO: 520), последовательность D (SEQ ID NO: 521), последовательность E (SEQ ID NO: 522), последовательность F (SEQ ID NO: 523), последовательность G (SEQ ID NO: 524), последовательность H (SEQ ID NO: 525), последовательность I (SEQ ID NO: 526), последовательность J (SEQ ID NO: 527), последовательность K (SEQ ID NO: 528), последовательность L (SEQ ID NO: 529), последовательность M (SEQ ID NO: 530), последовательность N (SEQ ID NO: 531), последовательность O (SEQ ID NO: 532), последовательность P (SEQ ID NO: 533), последовательность Q (SEQ ID NO: 534), при этом эти номера последовательностей соответствуют тем, которые приведены в WO 2007080392 или WO 2004/041862 (Ablynx N.V.). В определенных вариантах осуществления V_{HH} Camelid связывается с сывороточным альбумином человека и включает аминокислотную последовательность, которая идентична по крайней мере на приблизительно 80%, или по крайней мере на приблизительно 85%, или по крайней мере на приблизительно 90%, или по крайней мере на приблизительно 95%, или по крайней мере на приблизительно 96%, или по крайней мере на приблизительно 97%, или по крайней мере на приблизительно 98%, или по крайней мере на приблизительно 99% по аминокислотной последовательности ALB1, раскрытой в WO 2007080392, или любой из SEQ ID NO: 518-534, при этом эти номера последовательностей соответствуют тем, которые приведены в WO 2007080392 или WO 2004/041862.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, агонист или антагонист включают направленный против сывороточного альбумина dAb, который конкурирует с любым направленным против сывороточного альбумина dAb, раскрытым здесь, за связывания с сывороточным альбумином (например, сывороточным альбумином человека).

В альтернативном варианте осуществления агонист, антагонист или лиганд включают связывающую составляющую, специфичную в отношении антигена-мишени (например, TNFR1 человека), причем составляющая включает неиммуноглобулиновые последовательности, раскрытые в находящейся одновременно на рассмотрении заявке PCT/GB2008/000453, поданной 8 февраля 2008 г., описание этих связывающих составляющих, способов их продуцирования и отбора (например, из разнообразных библиотек) и их последовательностей включено сюда посредством ссылки в качестве части описания настоящего изобретения).

Конъюгация с удлиняющей период полувыведения составляющей (например, альбумином).

В одном варианте осуществления (одну или более) удлиняющую период полувыведения составляющую (например, альбумин, трансферрин и их фрагменты и аналоги) конъюгируют или связывают со связывающим антиген-мишень полипептидом, dAb, агонистом или антагонистом настоящего изобретения. Примеры альбумина, фрагментов альбумина или вариантов альбумина, подходящих для использования в связывающей антиген-мишень форме, описаны в WO 2005077042 (US2005186664), описание которой включено сюда посредством ссылки и образует часть описания настоящего изобретения. В частности, в настоящем изобретении могут использоваться следующие альбумин, фрагменты альбумина или варианты альбумина:

SEQ ID NO: 1 (представленная в WO 2005077042, при этом эта последовательность однозначно включена в описание настоящего изобретения посредством ссылки);

фрагмент или вариант альбумина, включающий или состоящий из аминокислот 1-387 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042;

альбумин, его фрагмент или вариант, включающий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из (a) аминокислот 54-61 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (b) аминокислот 76-89 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (c) аминокислот 92-100 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (d) аминокислот 170-176 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (e) аминокислот 247-252 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (f) аминокислот 266-277 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (g) аминокислот 280-288 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (h) аминокислот 362-368 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (i) аминокислот 439-447 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042 (j) аминокислот 462-475 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; (k) аминокислот 478-486 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042; и (l) аминокислот 560-566 SEQ ID NO: 1 в WO 2005077042.

Дополнительные примеры альбумина, фрагментов и аналогов, подходящих для использования в связывающей антиген-мишень форме, описаны в WO 03076567 (US2008108560), описание которой включено сюда посредством ссылки и которая образует часть описания настоящего изобретения. В частности, в настоящем изобретении могут использоваться следующие альбумин, фрагменты или варианты:

сывороточный альбумин человека, описанный в WO 03076567, например, на фиг. 3 (при этом эта информация о последовательности однозначно включена в описание настоящего изобретения посредством ссылки);

сывороточный альбумин человека (HA), состоящий из одной негликозилированной полипептидной цепи из 585 аминокислот с молекулярной массой по формуле, составляющей 66500 (см., Meloun, et al., FEBS Letters 55:136 (1975); Behrens, et al., Fed. Proc. 34:591 (1975); Lawn, et al., Nucleic Acids Research

9:6102-6114 (1981); Minghetti, et al., J. Biol. Chem. 261:6747 (1986));

полиморфный вариант или аналог или фрагмент альбумина, описанный в Weitkamp, et al., Ann. Hum. Genet. 37:219 (1973);

фрагмент или вариант альбумина, описанный в EP 322094, например, HA(1-373), HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369) и HA(1-419) и фрагменты между 1-369 и 1-419;

фрагмент или вариант альбумина, описанный в EP 399666, например, HA(1-177) и HA(1-200) и фрагменты между HA(1-X), где X является любым числом от 178 до 199.

Если (одна или более) удлиняющая период полувыведения составляющая (например, альбумин, трансферрин и их фрагменты и аналоги) используется для задания формы связывающих антиген-мишень полипептидов, dAb, агонистов и антагонистов настоящего изобретения, ее конъюгируют с использованием любого подходящего способа, такого как прямое слияние со связывающей антиген-мишень составляющей (например, направленным против TNFR1 dAb), например, посредством использования единственной нуклеотидной конструкции, которая кодирует гибридный белок, причем гибридный белок кодируется в виде одной полипептидной цепи с удлиняющей период полувыведения составляющей, являющейся N- или C-концевой относительно связывающей антиген-мишень составляющей.

Альтернативно, конъюгацию можно успешно выполнить, используя пептидный линкер между составляющими, например, пептидный линкер, описанный в WO 03076567 (US2008108560) или WO 2004003019 (при этом описания этих линкеров включены посредством ссылки в описание настоящего изобретения для предоставления примеров для использования в настоящем изобретении). В одном варианте осуществления конъюгацию можно осуществить благодаря линкеру со спиральной структурой, такому как линкер со спиральной структурой, описываемый здесь. Будет также понятно, что другие линкеры, которые могут применяться для этой цели, включают такие линкеры, как богатые глицином-серином линкеры. В одном варианте осуществления линкером может быть устойчивый к протеазе линкер. Как правило, полипептидом, удлиняющим период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, является полипептид, который встречается в природе *in vivo* и который не поддается деградации или удалению эндогенными механизмами, которые удаляют нежелательный материал из организма (например, человека). Например, полипептид, удлиняющий период полувыведения в сыворотке - *in vivo*, можно выбрать из белков экстракционного матрикса, белков, обнаруживаемых в крови, белков, обнаруживаемых в гематоэнцефалическом барьере или в нервной ткани, белков, находящихся в почке, печени, легком, сердце, коже или кости, стресс-белков, специфичных в отношении заболеваний белков или белков, вовлеченных в перенос Fc.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, описываемых на всем протяжении этого описания, предусматривается, что вместо использования направленного против антигена-мишени "dAb" в агонисте, антагонисте или лиганде настоящего изобретения квалифицированный специалист, к которому обращено настоящее изобретение, может использовать полипептид или домен, который включает один или более, или все 3 CDR dAb настоящего изобретения, который связывается с антигеном-мишенью (например, CDR, пересаженные в подходящий белковый остов или каркас, например, молекулу Affibody, остов SpA, домен LDL-рецепторов класса A или домен EGF). Описание в целом должно рассматриваться соответственно для предоставления описания агонистов или антагонистов, в которых используются такие домены вместо dAb. В этом отношении см. WO 2008096158 (US2009259026), описание которой включено посредством ссылки.

Следовательно, в одном варианте осуществления агонист или антагонист настоящего изобретения включает единичный вариабельный домен иммуноглобулина или доменное антитело (dAb), который обладает специфичностью связывания в отношении антигена-мишени, или определяющие комплементарность участки такого dAb в подходящей форме. Агонист или антагонист может быть полипептидом, который состоит из такого dAb или по существу состоит из такого dAb. Агонист или антагонист может быть полипептидом, который включает dAb (или CDR dAb) в подходящей форме, такой как антительная форма (например, IgG-подобная форма, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), или лигандом с двойной специфичностью, включающим dAb, который связывается с антигеном-мишенью, и второй dAb, который связывается с другой мишенью-белком, -антигеном или -эпитопом (например, сывороточным альбумином).

Полипептиды, dAb, агонисты и антагонисты в соответствии с настоящим изобретением могут быть заданы в виде ряда подходящих антительных форм, которые известны в данной области техники, таких как IgG-подобные формы, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антител, гомодимеры и гетеродимеры тяжелых цепей и/или легких цепей антител, антигенсвязывающие фрагменты любой из вышеприведенных форм (например, Fv-фрагмент (например, одноцепочечный Fv(scFv), Fv с дисульфидными связями), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент), единичный вариабельный домен (например, V_H, V_L), dAb и модифицированные варианты любой из вышеприведенных форм (например, модифицированные с помощью ковалентного присоединения полиалкиленгликоля (например, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полибутиленгликоля) или другого подходящего полимера).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечивается лиганд (например, направленный против TNFR1 антагонист), который является IgG-подобной формой. Такие формы имеют обычную четырехцепочечную структуру молекулы IgG (2 тяжелых цепи и две легких цепи), в которой

одна или более переменных областей (V_H и/или V_L) были замещены dAb настоящего изобретения. В одном варианте осуществления каждая из переменных областей (2 V_H -областей и 2 V_L -областей) замещена dAb или единичным переменным доменом, по крайней мере один из которых является направленным против антигена-мишени dAb в соответствии с настоящим изобретением. dAb или единичный переменный домен(ы), которые включены в IgG-подобную форму, могут обладать одинаковыми специфичностями или различными специфичностями. В некоторых вариантах осуществления IgG-подобная форма является четырехвалентной и может обладать одной (только в отношении антигена-мишени), двумя (например, в отношении антигена-мишени и SA), тремя или четырьмя специфичностями. Например, IgG-подобная форма может быть моноспецифической и включает 4 dAb, которые обладают одинаковой специфичностью; биспецифической и включает 3 dAb, которые обладают одинаковой специфичностью, и другой dAb, который обладает отличной специфичностью; биспецифической и включает два dAb, которые обладают одинаковой специфичностью, и два dAb, которые обладают общей, но отличной специфичностью; триспецифической и включает первый и второй dAb, которые обладают одинаковой специфичностью, третий dAb с отличной специфичностью и четвертый dAb со специфичностью, отличной от таковой первого, второго и третьего dAb; или тетраспецифической и включает четыре dAb, каждый из которых обладает отличной специфичностью. Можно приготовить антигенсвязывающие фрагменты IgG-подобных форм (например, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv). В одном варианте осуществления IgG-подобные формы или их антигенсвязывающие фрагменты не связывают перекрестно антиген-мишень, например, форма может быть одновалентной в отношении антигена-мишени. Если желательна функция активации комплемента и/или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), лигандом может быть IgG1-подобная форма. Если желательно, IgG-подобная форма может включать мутированную константную область (вариант константной области тяжелой цепи IgG) для минимизации связывания с Fc-рецепторами и/или способности к фиксации комплемента (см. например, Winter et al., GB 2209757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, 22 декабря 1994).

Лиганды настоящего изобретения (полипептиды, dAb, агонисты и антагонисты) могут быть заданы в форме гибридного белка, который содержит первый единичный переменный домен иммуноглобулина, непосредственно слитый со вторым единичным переменным доменом иммуноглобулина. Если желательно, такая форма может, кроме того, включать удлиняющую период полувыведения составляющую. Например, лиганд может включать первый единичный переменный домен иммуноглобулина, непосредственно слитый со вторым единичным переменным доменом иммуноглобулина, который непосредственно слит с единичным переменным доменом иммуноглобулина, связывающим сывороточный альбумин.

Обычно расположение полипептидных доменов, имеющих сайт связывания, со специфичностью связывания мишени и то, включает ли лиганд линкер, является предметом выбора конструкции. Однако некоторые расположения, с использованием линкеров или без них, могут обеспечить лучшие характеристики связывания, чем другие расположения. Настоящим изобретением охватываются все расположения (например, dAb1-линкер-dAb2; dAb2-линкер-dAb1, и лиганды, имеющие расположение, обеспечивающее желаемые характеристики связывания, можно легко идентифицировать посредством скрининга).

Полипептиды и dAb в соответствии с настоящим изобретением, в том числе мономеры, димеры и тримеры dAb, могут быть связаны с Fc-областью антитела, включающей один или оба из C_H2- и C_H3-доменов, и необязательно шарнирную область. Для приготовления таких полипептидов могут использоваться, например, векторы, кодирующие лиганды, связанные в виде одной нуклеотидной последовательности с Fc-областью. Кроме того, настоящим изобретением обеспечиваются димеры, тримеры и полимеры вышеотмеченных мономеров dAb.

Пояснение на примерах

Пример 1.

Цель исследования.

Целью исследования было получение устойчивых к протеазе вариантов слияний GLP-1-AlbudAbTM посредством выполнения отбора фагов на библиотеках, происходящих из варианта GLP-1, включающего устойчивый к DPP IV GLP-1 (называемый здесь *GLP-1), в сочетании с обработкой фагов различными протеазами (в том числе протеазами, встречающимися в природе в экспрессионном хозяине). Как здесь описано, AlbudAbTM представляет собой единичный переменный домен иммуноглобулина, который специфически связывает сывороточный альбумин.

Рецептор GLP-1.

Рецептор для глюканоподобного пептида 1 (GLP-1R) относится к семейству B1 из семи трансмембранных, связанных с G-белком рецепторов. Взаимодействия при связывании между рецептором и его являющимся природным агонистом лигандом GLP-1 инициируются при связывании лиганда с экстраклеточным N-концевым доменом рецептора (ECD GLP-1R) с последующим взаимодействием с центральной трансмембранной частью (Al-Sabah et al., 2003; FEBS Lett; 553(3):342-6). Было установлено, что связывание GLP-1 с выделенным N-концевым доменом сохраняется при удалении трансмембранной центральной части, хотя аффинность снижается (Lopez de Maturana et al., 2003; J. Biol. Chem; 278 (12):10195-

200). Поскольку в случае отбора фагов в растворе использование целого рецептора является нежелательным, из-за плохой растворимости рецепторов с трансмембранными доменами в водном растворе без солибилизирующих детергентов, выделенный экстраклеточный домен использовали для улавливания фагов для упрощения эксперимента и обогащения фагов, представляющих молекулы с аффинностью к ECD GLP-1R.

Нуклеотидной и аминокислотной последовательностями для мономера ECD GLP-1R с His-меченым Fc являются следующие последовательности.

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:1):

```

ATG GCC GGC GCG CCCC GGC CCC GCT GCG CCTT GCG CTG CTGC TGCT CGGGAT
GGT GGG CAGG GCC GGC CCC GCG GCG GCG GCG TGCC ACT GTG TCC CTCTGGG
AGAC GGTGCA GAA ATG GCGA GAAT ACC GAC GCC AGT GCCA GCG CTC CCGT
ACT GAG GATC CAC CTC TGC CAC AGA CTTG TTCT GCA ACC GGAC CTC CGA
TGA ATAC GCC TGCT GGC CAG ATG GGG AGC AGG CTCTG TTC GTGA ATGTCA
GCT GCG CCTG GTAC CTG CCC TGG GCG AGCA GTGT GCG GCA GGG CCGCTG
TAC CGG TTTCT GCAC AGCTGA AGG CCTCTGG CTGC AGA AGG ACA ACTCCAG
CCT GCG CCTGG AGGG ACTTGT CGG AGT GCGA GGAG TCCAAG CGAG GGGGAGA
GAAG CTC CCC GGAG GAG CAG CTC CTG TTC TCA AGCTTGA GCG CAAATCG
GCC GAC AAAA CTC ACACATC ACC ACCGTCA CCAG CACCTG AACT CTC TGGG
GGG ACCGTCA GTCT TCTCT TCCCC CAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGA
TCT CCC GAC CCCT GAG GTC ACAT GCGTGG TGG TGGACGT GAG CCACGAA
GAC CCGT GAG TCA AGTTCAA CTGG TACGTG GAC GCGCTGG AGGTGCATAA
TGCCA AGACA AAG CCGCGGG AGG AGCAGTA CAAC AGCACG TAC CGGGTGG
TCAG CGT CCT CAC CGT CCTG CAC CAG GACT GGCT GAATGG CAAG GAGTAC
AAG TGCAAGG TCT CCAACAA AGCC CTC CCA GCG CCGATCG AGAAA ACCAT
CTCCA AAGCC AAAG GGCAGC CCG GAGAACC ACAG GTGTAC ACCCT GCGCC
CAT CCC GGA TGAG CTG ACC AAG AAC CAG TCAG CCTGAC CTG CCTGGTC
AAAG GCTTCT ATCCC AGCGA CAT CGCCGTG GAG TGGGAGA GCAAT GGGCA
GCC GAGAAC AACT ACAAGA CCAC GCGCTCC CGTG CTGGAC TCC GACGGCT
CCTTCTTCT CTAC AGCAAG CTC ACCGTGG ACAAG AGCAG GTGG CAGCAG
GGGA ACGTCT TCTCATGCT CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACA ACCACTA
CAC GCAGAAG AGCCTCTCC TGTCTCCGG TAAACATCAC CATCATCATC
ACTGA

```

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2):

```

MAGAPGLRL ALLLLGMVGR AGPRPQGATV SLWETVQKWR EYRRQCQRSL
TEDPPPATDL FCNRTFDEYA CWPDGEPGSF VNVSCPWYLP WASSVPQGHV
YRFCTAEGW LQKDNSSLPW RDLSECEESK RGERSSPEEQ LLFLKLEPKS
ADKHTHSPPS PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
PEVKNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKHH HHHH

```

ECD GLP-1 был также экспрессирован с меткой в виде Fc IgG, которая создает возможность первоначальной очистки белка на агарозе с белком А. Во время отборов фагов растворимый рецептор можно было затем захватить, используя покрытые белком А частицы.

Отборы исследуемых фагов.

Были выполнены проверки для подтверждения того, что экстраклеточный домен рецептора GLP-1 можно использовать для отборов из библиотек фагового дисплея.

Вектор в виде фага.

Был использован вектор для дисплея в виде нитевидного бактериофага (fd), pDOM34 (который является производным pDOM4), который основан на векторе fd с тус-меткой, и в который можно клонировать последовательность белка между рестрикционными сайтами для обеспечения слияния белок-ген III. (pDOM4, описанный в WO 2007/085815, является производным вектора в виде фага Fd, в котором сигнальная пептидная последовательность гена III заменена сигнальным пептидом закрепляемого на гликолипиде поверхностного белка дрожжей (GAS) (WO 2005/093074). Он также содержит с-тус-метку между лидерной последовательностью и геном III, что возвращает ген III в рамку считывания).

Модификации pDOM4, которые приводят к pDOM34, включают:

- 1) удаление сайта для NcoI в 7476 нуклеотидном положении pDOM4;
- 2) делецию Мус-метки, слитой с N-концом сpIII;
- 3) введение сайта рестрикции для NcoI для способствования клонированию непосредственно после сигнального пептида.

Гены, кодирующие наборы библиотеки, клонировали в виде NcoI/NotI-фрагментов.

Вектор размножали в клетках E.coli MachI, выделяли с использованием набора Plasmid Mega Prep (Qiagen), и суперспиральную фракцию выделяли с помощью ультрацентрифугирования в градиенте цезия хлорида, используя стандартные методы (Sambrook and Maniatis 1989). Вектор разрезали ферментами NcoI и NotI, а затем PstI для уменьшения степени лигирования на себя. После экстракции фено-

лом/хлороформом ДНК осаждали этанолом и очищали от ненужного "вкладыша" - фрагмента ДНК между сайтами NcoI и NotI на колонках Chromaspin TE-1000 (Clontech). После очистки векторную ДНК использовали для пробных лигирований с разнообразными фрагментами ДНК DAT-X.

Конструирование библиотеки DAT-X.

Было сконструировано восемнадцать наборов на основе родительской молекулы DAT-X, включающей устойчивый к DPP IV GLP-1, который в дальнейшем будет называться *GLP-1.

*GLP-1 (7-37):

Аминокислотная последовательность:

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:3)

Нуклеотидная последовательность:

CATGGTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAA

GCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGA (SEQ ID

NO:4)

Родительская молекула DAT-X, кроме того, включает слияние с DOM7h-14 (доменным антителом (dAb), связывающим сывороточный альбумин (альбудабом; AlbudAbTM)).

DOM7h-14:

Аминокислотная последовательность:

DIOMTOSPSSLSASVGDRVTTTCRASOWIGSOLSWYOOKPGKAPKLLIMWRSSL

QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

(SEQ ID NO:5)

Нуклеотидная последовательность:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACC

GTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTG

GTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTC

CTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGAC

AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTAC

TACTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAG

GTGGAAATCAAACGG (SEQ ID NO: 6)

*GLP-1 и DOM7h-14 в родительской молекуле DAT-X связаны с помощью линкера со спиральной структурой.

Линкер со спиральной структурой.

Аминокислотная последовательность:

KEAAAKEAAAKEAAAKELAAKEAAAKEAAAKEAAAKELAA (SEQ ID NO: 7)

Нуклеотидная последовательность:

AAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAG

AATTGGCCGCAAAAGAAGCGGGCGGCGAAAGAAGCGGGCGGCGAAAGAAGCG

GCGGCGAAAGAATTGGCCGCA (SEQ ID NO: 8)

Для охвата всей последовательности *GLP-1 (исключая сайты, которые, как известно, важны для связывания с рецептором (описанные, например, в Sarrauste de Menth  re et al. Eur J Med Chem. 2004 Jun; 39 (6): 473-480; Neidigh et al. Biochemistry. 2001 Nov 6; 40 (44):13188-00; Hjorth et al. J Biol Chem. 1994 Dec 2; 269 (48): 30121-24 и Gallwitz et al. Regul Pept. 1996 May 7; 63(1):17-22)), было сконструировано 17 наборов, используя протокол сборочной ПЦР с использованием полимеразы с высокой точностью воспроизведения Phusion (NEB) в составляющем 50 мкл объеме реакции. Четыре рандомизированных нуклеотида на библиотеку вводили с помощью праймеров в первичные ПЦР, а затем сборку осуществляли с использованием биотинилированных праймеров. С помощью допускающей ошибки ПЦР, используя набор Mutazyme II (Stratagene), биотинилированные праймеры и 5-50 пг матрицы на 50 мкл реакции, были введены случайные мутации в *GLP-1. Из-за короткой длины нуклеотидной последовательности *GLP-1 допускающую ошибку ПЦР выполняли дважды для увеличения степени мутаций.

После расщепления NcoI и NotI вставки очищали от не расщепленных продуктов с помощью покрытых стрептавидином частиц. Проводили пробное лигирование, при котором расщепленные продукты лигировали в pDOM34 в соответствующие сайты.

Секвенирование клонов пробного лигирования подтвердило ожидаемое внесение разнообразия во всех библиотеках, поэтому последовало полномасштабное лигирование и трансформация библиотек. Лигирование выполняли в общем объеме 500 мкл, с использованием 1 мкг расщепленного вектора и вставки в соотношении 1:2, с помощью T4 ДНК-лигазы (NEB). Каждую библиотеку трансформировали двумя долями, 10 мкл на 100 мкл электрокомпетентных клеток *E.coli* TB1, и после восстановления добавляли 100 мл среды на 1 ч при 37°C со встряхиванием, библиотеки высевали на большие (22 см) чашки

квадратной формы, содержащие 2хТҮ-Tet-агар. Чашки инкубировали в течение ночи, а затем соскребали в 5 мл 2хТҮ с 15% глицерина для приготовления штоков. Размеры библиотек находились в пределах 10^7 - 10^8 трансформантов.

Для приготовления библиотеки фагов культивирование библиотеки запускали посредством внесения 100 мкл штока в глицерине в 200 мкл среды 2хТҮ, содержащей антибиотик, из условия, чтобы конечная плотность культуры непосредственно после внесения не превышала $ОП_{600}=0,1$. Библиотеки культивировали в течение ночи - в течение приблизительно 18 ч при 37°C со встряхиванием. Культуру осаждали центрифугированием, и библиотеки фагов готовили посредством двойного осаждения с использованием ПЭГ и ресуспендировали в PBS.


Случайным образом выбирали несколько клонов из не отвергнутых отбору библиотек для секвенирования, чтобы подтвердить успешное конструирование библиотек, и первого цикла пэннинга после приготовления библиотек фагов.

Способы пэннинга, приготовления штоков в глицерине и увеличения численности фагов являются описываемыми ниже способами, кроме особо оговоренных случаев.

Для пэннинга использовали экстраклеточный домен рецептора GLP-1. 100 мкл библиотек фагов инкубировали с 2% Marvell-PBS, содержащем 100 нМ GLP-1R. Инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем фаги объединяли с заранее заблокированными (2% Marvell-PBS, 1 ч, комнатная температура) частицами Dynabeads (Dyna) с белком А. После инкубации в течение 1 ч на вращающемся механизме при комнатной температуре частицы промывали в системе для очистки KingFisher (Thermo Electron Corporation) восемь раз с использованием 0,1% Tween-PBS (робототехническое устройство KingFisher автоматизирует процесс промывки посредством использования магнитного датчика для переноса частиц из раствора для промывки в раствор для промывки), и специфические фаги выделяли посредством элюирования в 500 мкл 0,1 М глицина, рН 2,0. После нейтрализации с использованием 100 мкл 1 М Трис-Cl, рН 8,0, фаг использовали для инфицирования клеток E.coli TGI в фазе логарифмического роста в течение 45 мин при 37°C. Инфицированные клетки высевали на чашки с агаром-Tet, которые выращивали в течение ночи при 37°C.

Титры библиотек, на входе, на выходе, и размер библиотек представлены в таблице ниже.

Библиотека	Размер библиотеки	1-ый отбор: фаг ф/мл	
		Титр на входе	Титр на выходе
1	2.8×10^8	3.9×10^{10}	3.2×10^7
2	1.2×10^8	1.0×10^{11}	1.0×10^6
3	2.4×10^7	4.6×10^{10}	7.0×10^5
4	8.0×10^7	1.0×10^{11}	8.0×10^6
5	4.0×10^7	2.6×10^9	1.0×10^7
6	8.0×10^7	7.3×10^{10}	6.0×10^6
7	4×10^7	8.0×10^9	6.0×10^6
8	2.8×10^7	5.4×10^9	1.0×10^7
9	6.8×10^7	9.4×10^9	5.0×10^6
10	2.0×10^8	5.7×10^8	1.5×10^6
11	8.8×10^8	4.5×10^9	2.0×10^6
12	6.6×10^8	4.0×10^9	1.6×10^6
13	1.8×10^8	6.7×10^{10}	2.0×10^5

14	4.8×10^7	6.0×10^9	3.0×10^5
15	6.0×10^7	4.2×10^{10}	1.0×10^6
16	2.4×10^8	1.6×10^{10}	4.8×10^5
17	4.2×10^8	1.3×10^{10}	1.4×10^6
18 Допуская ошибки ПЦР	1.5×10^8	2.5×10^9	6.0×10^5
Лигирование на себя	4.0×10^5		
Контроль DAT-X	-	4.0×10^9	1.8×10^7

Первый цикл отбора дал приемлемый выход в случае всех библиотек.

Штоки в глицерине готовили соскабливанием колоний с чашек с агаром в 2 мл среды 2ХТУ, содержащей 15% глицерина, и их аликвоты помещали в криогенные флаконы.

Последующие отборы проводили на объединенных фагах. Увеличенный в численности фаг получали посредством совместного культивирования штоков в глицерине E.coli, содержащих выходы после 1-го отбора всех 18 библиотек. Культивирование запускали внесением 50 мкл штока в глицерине каждой подвергнутой пэннингу библиотеки в 1 л среды 2хТУ с антибиотиком. Культуру делили на две колбы-качалки-21, пол-литра в каждую, и культивировали в течение ночи при 37°C со встряхиванием при 250 оборотов/мин. Фаг готовили через 18-20 ч культивирования с помощью одного осаждения с использованием ПЭГ и ресуспендировали в PBS.

Отбор из библиотек фагового дисплея DAT-X с использованием протеазы.

Увеличенный в численности фаг на выходе после 1-го отбора использовали для дальнейших отборов с использованием постоянной концентрации GLP-1R, 100 нМ. Кроме того, перед отбором с использованием трипсина серию фагов на выходе после 1-го отбора субклонировали с мутированием R108W в последовательность AlbudAb. Эта мутация придает клону AlbudAb Vκ большую устойчивость к обработке трипсином при представлении на фаге. Это обусловлено тем, что остаток аргинина на карбоксильном конце dAb, который связывает доменное антитело с белком pIII, является чувствительным к трипсину. Мутация в этом сайте удаляет сайт расщепления трипсином и увеличивает нацеленность отборов с использованием протеаз на желаемую область целевого пептида. Таким образом, готовые две серии фагов, с мутацией R108W в AlbudAb или без нее, использовали во втором цикле отбора.

Фаг обрабатывали протеазами трипсином или химотрипсином в различных концентрациях или ос-

тавляли не обработанным до инкубации с рецептором в течение 1 ч при комнатной температуре.

Титры при 2-ом отборе (ф/мл) представлены в таблице ниже.

Ф	Протеаза	На входе	Без протеазы	1 мкг/мл	10 мкг/мл
DAT-X с+	α -химотрипсин	2×10^{10}	7×10^6	4×10^5	$< 1 \times 10^4$
R108W с+	трипсин	2×10^{10}	6×10^7	3×10^6	4×10^4
Библиотеки 1-18	α -химотрипсин	2×10^{11}	3×10^8	2×10^6	3×10^4
R108W	трипсин	1×10^{12}	1×10^8	1×10^7	3×10^6

Фаги на выходе после каждого отбора (0 мкг/мл-10 мкг/мл) увеличивали в численности посредством внесения 50 мкл штока в глицерине в 50 мл 2хТУ с Tet и культивирования в течение ночи, 20 ч, при 37°C со встряхиванием. Очищенный фаг использовали для 3-го цикла отбора, с использованием тех же условий инкубации.

Титры при 3-ем отборе (ф/мл) представлены в таблице ниже.

		α -химотрипсин			
Ф на выходе после 2-ого отбора с использованием концентрации	На входе	Без протеазы	1 мкг/мл	10 мкг/мл	
Библиотеки 1-18_ Без протеазы	1×10^{10}	7×10^8	5×10^4	$\sim 1 \times 10^2$	
Библиотеки 1-18_ 1 мкг/мл	1×10^{10}	8×10^7	5×10^4	$\sim 1 \times 10^3$	
Библиотеки 1-18_ 10 мкг/мл	1×10^{10}	2×10^8	1×10^6	1×10^4	
Контроль DAT-X	1×10^{10}	5×10^6	6×10^4	ND	

		Трипсин			
Ф на выходе после 2-ого отбора с использованием концентрации	На входе	Без протеазы	1 мкг/мл	10 мкг/мл	
Библиотеки 1-18 с R108W_ Без протеазы	2×10^{11}	2×10^9	1×10^7	1×10^6	
Библиотеки 1-18 с R108W_ 1 мкг/мл	1×10^{11}	5×10^8	1×10^7	2×10^5	
Библиотеки 1-18 с R108W_ 10 мкг/мл	1×10^{11}	7×10^7	1×10^7	1×10^6	

Контроль DAT-X с R108W	3×10^{10}	1×10^7	1×10^7	3×10^4
------------------------	--------------------	-----------------	-----------------	-----------------

Поскольку разнообразие клонов было уже уменьшено после 3-го цикла, что подтверждено секвенированием репрезентативного набора клонов, небольшое количество клонов на выходах после отбора экспрессировали в виде растворимых белков, как детализировано ниже.

Выходы после отборов из библиотек фагового дисплея DAT-X.

Несколько вариантов *GLP-1 были выбраны для клонирования в виде слияния с AlbuAb, но с использованием альтернативных линкеров, описываемых ниже, экспрессированы и проанализированы в анализе связывания с рецептором GLP-1. Их аминокислотные последовательности представлены как последовательности 1-10 (см. фиг. 1). Один вариант последовательности *GLP-1 (последовательность 7) присутствовал в большом количестве на выходе после отборов с использованием обработки как химотрипсином, так и трипсином, и поскольку это слияние названо DMS7149, при использовании химотрипсина на выходе присутствовали два варианта (DMS7150 (последовательность 8) и DMS7151 (последовательность 9)), один вариант (DMS7148 (последовательность 6)) наблюдался на выходе, когда только природные протеазы функционировали в клетках во время экспрессии и отбора фагов, а предварительная обработка трипсином или химотрипсином не использовалась, и один вариант клонировали для удаления сайтов расщепления трипсином (DMS7152 (последовательность 10)).

Белки с аминокислотными последовательностями 1-4 (см. фиг. 1) были проанализированы и продемонстрировали низкую активность относительно GLP-1 и контрольного варианта DAT-X. Секвенирование по Эдману наводило на мысль, что белки были неправильно процессированы.

Было выполнено клонирование при введении мутаций в клон DAT-Y, который включает *GLP-1, слитый с DOM7h-14 с помощью альтернативного линкера, имеющего аминокислотную последовательность: PSS (SEQ ID NO: 9) и нуклеотидную последовательность: CCAAGCTCG (SEQ ID NO: 10).

Выбранные мутации были введены в последовательность *GLP-1 с помощью праймеров в первичной ПЦР, а в сборочной ПЦР были введены сайты расщепления NcoI и BamHI на 5'- и 3'-конце, соответственно, последовательности слияния.

Продукт сборочной ПЦР расщепляли рестрикционными эндонуклеазами NcoI и BamHI.

Для клонирования был приготовлен экспрессионный вектор pDOM35.

Вектор pDOM35 является производным pET12a с модификациями:

осуществлено изменение последних трех остатков сигнального пептида OmpT с SFA на AWA, что улучшило процессирование в правильном сайте сигнальной пептидазой E.coli;

введен сайт для NcoI для способствования клонированию непосредственно после сигнального пептида;

между сайтами для NcoI и BamHI присутствует "вкладыш".

pDOM35 расщепляли NcoI и BamHI, и разрезанные продукты сборочной ПЦР лигировали с вектором с использованием набора для лигирования Quick (NEB). 2 мкл смеси после лигирования использовали для трансформации клеток MachI, и после восстановления клетки засеивали на чашки с агаром, содержащим карбенициллин, и выращивали в течение ночи. Колонии подвергали секвенированию, и колонии, содержащие правильную последовательность, использовали для размножения плазмиды и ее выделения (набор Plasmid Mini Prep, Qiagen). Клетки BL21 (DE3) трансформировали плазмидной ДНК, и результирующие колонии использовали для внесения в культуру для экспрессии.

Экспрессию выполняли посредством внесения 50 мл культуры в среду 2xTY, дополненную растворами для самоиндукции Overnight Express™ (1 миллилитром раствора 1 (каталожный № 71298), 2,5 миллилитрами раствора 2 (каталожный № 71299), 50 микролитрами раствора 3 (каталожный № 71304), Novagen) и 100 мкг на 1 мл карбенициллина. Культивирование проводили в течение ночи при 37°C, а затем супернатант культуры осветляли центрифугированием при 3700×g в течение 45 мин. Затем экспрессированный белок очищали из осветленного супернатанта, используя обтекаемую форму белка L (GE Healthcare, каталожный № 28-4058-03, связанный белок L), и подвергали элюированию с белка L, используя 0,1 М глицин, pH 2,0, затем нейтрализовали с использованием 0,2 объемов 1 М Трис, pH 8,0.

Часть варианта *GLP-1 из DMS7148 также была клонирована в виде слияния DMS7161 (последовательность 11) с albudab с большей аффинностью, DOM7h-14-10, и с соединением с помощью альтернативного линкера PSS, в pDOM35, как описано ранее.

DOM7h-14-10.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 22):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSL

QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:23):

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACC

GTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTG

GTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTC

CTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGAC

AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTAC

TACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG

GTGGAAATCAAACGG

После трансформации плазмидной ДНК pDOM35, включающей последовательность DMS7161, в BL21(DE3) готовили шток в глицерине на основе выращенных колоний, соскабливанием колоний в минимальные среды с глюкозой и добавлением глицерина до конечной концентрации, составляющей приблизительно 15%. Экспрессию DMS7161 запускали внесением штока в глицерине в 50 мл минимальной среды (DMS7161 A), дополненной дрожжевым экстрактом до конечной концентрации 10 г/литр (DMS7161 B), чтобы получить плотность исходной культуры ОП600 = 0,024. Культуру выращивали до ОП600, составляющей приблизительно 1,4, при 30°C, затем индуцировали добавлением 0,1 мМ изопропил-бета-D-тиогаляктозида. Культивирование продолжали в течение дополнительных 24 ч при 23°C, а затем супернатант культуры осветляли центрифугированием при 3700×g в течение 45 мин. Затем экспрессированный белок очищали из осветленного супернатанта, используя белок L, и подвергали элюированию с белка L (GE Healthcare, каталожный № 28-4058-03, связанный белок L), используя 0,1 М глицин, pH 2,0, затем нейтрализовали с использованием 0,2 объемов 1 М Трис, pH 8,0.

Контроль качества DMS7148-52.

Белки DMS7148-52 экспрессировали и визуализировали на геле после электрофореза в SDS-ПААГ в невозстанавливающих условиях, клоны DMS7148 и DMS7161 хорошо экспрессировались в E.coli, при этом большая часть материала мигрировала с ожидаемым размером (фиг. 2, 3 и 4). С помощью анализов с использованием масс-спектрометрии (фиг. 5а) и секвенирования по Эдману была подтверждена целостность последовательности. Все другие белки DMS7148, каждый из которых содержит мутацию W25-D, и аспарагиновая кислота не создавала сайт расщепления для природной протеазы, функционирующей в клетках E.coli, подвергались деградации в аминокислотном и карбоксильном сайте 25-триптофана (продукты 24-142 и 26-142, соответственно), (фиг. 5 а)-f)). В остальных клонах также наблюдали продукт деградации 28-142.

Белок DMS7148 был исследован на активность в анализе связывания с рецептором GLP-1 в соответствии со следующим протоколом.

Предпосылка: GLP-1R представляет собой 7ТМ, связанный с G-белком рецептор, который представлен на клетках CHO. Активация рецептора пептидом GLP-1 или его аналогами приводит к превра-

щению АТФ в цАМФ под действием аденилатциклазы, которая сцеплена с рецептором. Клетки CHO устойчиво трансфицированы геном-репортером 6CRE/luc. Во время продуцирования цАМФ после активации рецептора пептидом GLP-1 промотор гена (содержащий 6 копий отвечающих на цАМФ элементов - 6CRE) запускает экспрессию гена-репортера люциферазы. Люцифераза затем катализирует реакцию с люциферинном с порождением света, который можно измерить на люминометре.

Протокол: клетки CHO-6CRE-GLP1R (клетки CHO K1, устойчиво трансфицированные 6 отвечающими на цАМФ элементами, управляющими геном-репортером люциферазы, а также рецептором GLP-1 человека) засеивали в количестве 2×10^5 клеток/мл в суспензионные среды. Суспензионную культуру поддерживали в течение 48 ч. Затем клетки разводили в 15 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамине ($2,5 \times 10$ клеток/мл) и распределяли по 384-луночным планшета, содержащим 10 мкл/лунку исследуемого соединения.

После добавления контролей для анализа клетки возвращали в термостат на 3 ч при 37°C и 5% CO₂. После инкубации в лунки добавляли неизменный субстрат для люциферазы glo (Promega), как описано в наборе, и планшеты плотно закрывали самоклеющимися пленками для планшетов (Weber Marking Systems Inc., каталожный № 607780). Планшеты помещали в считывающее устройство (Packard TopCount) и предварительно инкубировали в течение 5 мин перед считыванием флуоресценции и нанесением на график результатов. Соединение было исследовано в диапазоне концентраций, подходящих для кривой зависимости, на основе которой рассчитывали pEC50.

Установлено, что белок DMS7148 является активным, однако менее активным, чем пептид GLP-1 (фиг. 6 и сводке ниже).

Молекула	pEC50	% от максимального ответа
DMS 7148	9.45	107
GLP 7-36	11.92	97

DMS7161 исследовали на активность в анализе GLP-1 в соответствии со следующим протоколом:
Способ.

Клетки CHO-6CRE-GLP1R быстро оттаивали посредством погружения наполовину флакона(ов) в водяную баню при 37°C, и содержимое флакона(ов) переносили в пробирку фирмы Falcon на 50 мл, и 10 мл среды для анализа RPMI (без фенолового красного) (Sigma, каталожный № R7509)+2 мМ L-глутамин (Gibco, каталожный № 25030)+15 мМ HEPES (Sigma, каталожный № H0887) добавляли в каждую пробирку. После подсчета и центрифугирования при 1200 оборотов/мин в течение 5 мин клетки ресуспендировали в объеме среды для анализа RPMI, соответствующем для получения 1×10^6 клеток на 1 мл, и по 50 мкл распределяли в каждую лунку прозрачного 96-луночного планшета с плоским дном для культивирования тканей (96-луночного планшета для культивирования тканей Costar, прозрачного, стерильного, каталожный № 3917). Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C/5%CO₂. На следующий день клетки извлекали из термостата, и в лунки добавляли 50 мкл заранее приготовленного контроля/образца, и планшет возвращали в термостат на 3 ч при 37°C и 5% CO₂.

Приготовление контроля GLP-1(7-36) (Sigma, каталожный № G814).

К 18 мкл среды для анализа RPMI в 96-луночном планшете с V-образным дном добавляют 2 мкл 1 мг/мл GLP-1(7-36) для предоставления 30 мкМ раствора. Добавляют 2 мкл 30 мкМ раствора к 298 мкл среды для анализа RPMI для предоставления 200 нМ раствора (в случае конечной концентрации в анализе, составляющей 100 нМ). Осуществляют последовательное разведение контроля 1:10 по вертикали планшета (15 мкл контроля + 135 мкл среды для анализа RPMI) для создания 8 точек кривой.

Приготовление контроля эксендина-4 (Sigma, каталожный № E7144).

К 198 мкл среды для анализа RPMI в 96-луночном планшете с V-образным дном добавляют 2 мкл 1 мг/мл эксендина-4 для предоставления 2,39 мкМ раствора. Добавляют 2 мкл 2,39 мкМ раствора к 237 мкл среды для анализа RPMI для предоставления 20 нМ раствора (в случае конечной концентрации в анализе, составляющей 10 нМ). Осуществляют последовательное разведение контроля 1:10 по вертикали планшета (15 мкл контроля + 135 мкл среды для анализа RPMI) для создания 8 точек кривой.

Приготовление неизвестных образцов.

Для приготовления неизвестных образцов используют то же руководство, что и в случае приготовления контролей. Готовят верхнюю концентрацию, превышающую в два раза конечную концентрацию, требуемую в анализе, и осуществляют разведение 1:10 по вертикали планшета.

Приготовление люциферазы (Promega, каталожный № E2620).

Извлекают необходимое число аликвот люциферазы Bright-Glo из морозильника и оттаивают при комнатной температуре в темноте. Для одного исследуемого планшета достаточен один 5 мл флакон.

Спустя период времени инкубации во все лунки добавляли 50 мкл реагента для люциферазы Bright-Glo, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин для допуска возникновения

лизиса клеток. Считывание люминесценции (импульсы в секунду) осуществляли с использованием считывающего устройства для микропланшетов M5e, при этом считывание для каждой лунки осуществляли в течение 0,1 с. Импульсы в секунду фоновых лунок, содержащих только клетки, вычитали из всех остальных лунок. Контрольные лунки (GLP-1(7-36) или эксендин-4) должны демонстрировать максимальную стимуляцию в наибольших концентрациях. Устанавливали кривые зависимости эффекта от концентрации неизвестных образцов, на основе которых рассчитывали EC50, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism или ExcelFit.

DMS7161 является активным с EC50 между 1,6 и 3,4 нМ, как продемонстрировано на фиг. 7 и суммировано ниже.

	EC50 (M)	pEC50
ex-4	3.6E-09	8.45
DMS7161 A	3.4E-09	8.47
DMS7161 B	1.6E-09	8.79

Установлено, что DMS7161 является настолько же активным, как и DMS7148.

Краткие выводы.

Отбор фагов из разнообразного слияния пептидов, которое было природно очень чувствительным к протеазам и подвергается деградации во время экспрессии в E.coli, позволил авторам настоящего изобретения идентифицировать вариант слияния *GLP-1, который является устойчивым к природным бактериальным протеазам и экспрессируемым в E.coli. Сайты для протеаз, которые были удалены в этом клоне, схожи с сайтами, распознаваемыми трипсином и химотрипсином, однако эта последовательность отсутствовала на выходе после отборов с использованием дополнительной обработки трипсином или химотрипсином.

Таблица последовательностей

Последовательность	SEQ ID NO:
Мономер ECD GLP-1R с His-меченым Fc	1
Нуклеотидная последовательность	
Мономер ECD GLP-1R с His-меченым Fc	2
Аминокислотная последовательность	
*GLP-I (7-37) Аминокислотная последовательность	3
*GLP-I (7-37) Нуклеотидная последовательность	4
DOM7h-14 Аминокислотная последовательность	5
DOM7h-14 Нуклеотидная последовательность	6
Линкер со спиральной структурой Аминокислотная последовательность	7
Линкер со спиральной структурой Нуклеотидная последовательность	8
PSS	9
PSS Нуклеотидная последовательность	10
DMS7190	11
DMS7191	12
DMS7192	13
DMS7193	14
DMS7194	15
DMS7148	16
DMS7149	17
DMS7150	18
DMS7151	19
DMS7152	20
DMS7161	21
DOM7h-14-10 Аминокислотная последовательность	22
DOM7h-14-10 Нуклеотидная последовательность	23

Список последовательностей

- <110> Glaxo Group Limited
Enever, Carolyn
Jespers, Laurent
Pupecka, Malgorzata
Tomlinson, Ian
- <120> СПОСОБЫ ОТБОРА УСТОЙЧИВЫХ К ПРОТЕАЗЕ ПОЛИПЕПТИДОВ
- <130> DB00064W0
- <150> 61/120,135
<151> 2008-12-05
- <160> 23
- <170> FastSEQ для версии 4.0 Windows
- <210> 1
<211> 1155
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> Мономер ECD GLP-1R с His-меченым Fc, Нуклеотидная последовательность
- <400> 1
atggcgcggcg cccccggccc gctgcgcctt gcgctgctgc tgcctgggat ggtgggcagg 60
gccggccccc gcccccaggg tgccactgtg tccctctggg agacgggtgca gaaatggcga 120
gaataccgac gccagtgcca gcgctccctg actgaggatc caccctctgc cacagacttg 180
ttctgcaacc ggaaccttga tgaatacgcc tgctggccag atggggagcc aggtcgttc 240
gtgaatgtca gctgcccctg gtacctgccc tgggccagca gtgtgccgca gggccacgtg 300
taccggttct gcacagctga aggcctctgg ctgcagaagg acaactccag cctgccctgg 360
agggacttgt cggagtgcga ggagtccaag cgaggggaga gaagctcccc ggaggagcag 420
ctcctgttcc tcaagcttga gccc aaatcg gccgacaaaa ctacacatc accaccgtca 480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 540
accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa 600
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 660
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg tacgggttgg tcagcgtcct caccgtcttg 720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agcctccca 780
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 840
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900
aaaggcttct atccagcga catgcctgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 960
aactacaaga ccacgctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat 1080
gaggtctctg acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaacatcac 1140
catcatcatc actga 1155
- <210> 2
<211> 384
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> Мономер ECD GLP-1R с His-меченым Fc, Аминокислотная последовательность
- <400> 2
Met Ala Gly Ala Pro Gly Pro Leu Arg Leu Ala Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Met Val Gly Arg Ala Gly Pro Arg Pro Gln Gly Ala Thr Val Ser Leu
20 25 30
Trp Glu Thr Val Gln Lys Trp Arg Glu Tyr Arg Arg Gln Cys Gln Arg

```

      35      40      45
Ser Leu Thr Glu Asp Pro Pro Ala Thr Asp Leu Phe Cys Asn Arg
 50      55      60
Thr Phe Asp Glu Tyr Ala Cys Trp Pro Asp Gly Glu Pro Gly Ser Phe
 65      70      75      80
Val Asn Val Ser Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp Ala Ser Ser Val Pro
      85      90      95
Gln Gly His Val Tyr Arg Phe Cys Thr Ala Glu Gly Leu Trp Leu Gln
      100      105      110
Lys Asp Asn Ser Ser Leu Pro Trp Arg Asp Leu Ser Glu Cys Glu Glu
      115      120      125
Ser Lys Arg Gly Glu Arg Ser Ser Pro Glu Glu Gln Leu Leu Phe Leu
      130      135      140
Lys Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
      145      150      155      160
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      165      170      175
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      180      185      190
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      195      200      205
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      210      215      220
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      225      230      235      240
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      245      250      255
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      260      265      270
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      275      280      285
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      290      295      300
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      305      310      315      320
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      325      330      335
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      340      345      350
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      355      360      365
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His His His His His His
      370      375      380

```

<210> 3

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> *GLP-1 (7-37) Аминокислотная последовательность

<400> 3

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
      20      25      30

```

<210> 4

<211> 93

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> *GLP-1 (7-37) Нуклеотидная последовательность

<400> 4

```
catgggtgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga gga 93
```

<210> 5

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DOM7h-14 Аминокислотная последовательность

<400> 5

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln
 20           25           30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45
Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg
 85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100           105
```

<210> 6

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DOM7h-14 Нуклеотидная последовательность

<400> 6

```
gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcaactggcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttgggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggtgt tgctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acgg 324
```

<210> 7

<211> 40

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер со спиральной структурой Аминокислотная последовательность

<400> 7

```
Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1           5           10           15
Glu Leu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
 20           25           30
Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala
 35           40
```

<210> 8
 <211> 120
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Линкер со спиральной структурой Нуклеотидная последовательность

 <400> 8
 aaagaagcgg cggcgaaaaga agcggcgggcgg aaagaagcgg cggcgaaaaga attggccgca 60
 aaagaagcgg cggcgaaaaga agcggcgggcgg aaagaagcgg cggcgaaaaga attggccgca 120

 <210> 9
 <211> 3
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> PSS

 <400> 9
 Pro Ser Ser
 1

 <210> 10
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> PSS Нуклеотидная последовательность

 <400> 10
 ccaagctcg 9

 <210> 11
 <211> 149
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> DMS7190

 <400> 11
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
 20 25 30
 Glu Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 35 40 45
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 50 55 60
 Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln
 85 90 95
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 100 105 110
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 115 120 125
 Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

130 135 140
Val Glu Ile Lys Trp
145

<210> 12
<211> 149
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DMS7191

<400> 12
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Gly Ala Asp Leu Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
20 25 30
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
35 40 45
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
50 55 60
Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
65 70 75 80
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln
85 90 95
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
100 105 110
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
115 120 125
Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
130 135 140
Val Glu Ile Lys Arg
145

<210> 13
<211> 159
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DMS7192

<400> 13
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ala Thr Ala Cys Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Cys Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
20 25 30
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu
35 40 45
Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
50 55 60
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile
65 70 75 80
Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
85 90 95
Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
100 105 110
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
115 120 125
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala
130 135 140
Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

145

150

155

<210> 14

<211> 154

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DMS7193

<400> 14

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1          5          10          15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Thr Gly Leu Glu Arg
          20          25          30
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile
          35          40          45
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
          50          55          60
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser
          65          70          75          80
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp
          85          90          95
Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
          100          105          110
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
          115          120          125
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe
          130          135          140
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
145          150

```

<210> 15

<211> 147

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DMS7194

<400> 15

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Phe Val Thr Tyr Leu Glu Gly
 1          5          10          15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Glu Ala
          20          25          30
Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
          35          40          45
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
          50          55          60
Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          65          70          75          80
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly
          85          90          95
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
          100          105          110
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
          115          120          125
Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
          130          135          140
Ile Lys Trp
145

```

<210> 16
 <211> 142
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DMS7148

<400> 16
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Asp Leu Val Glu Gly Arg Gly Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
 115 120 125
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

<210> 17
 <211> 142
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DMS7149

<400> 17
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Phe Val Thr Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
 115 120 125
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

<210> 18
 <211> 142
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DMS7150

<400> 18

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Met Thr Ser Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro
          20           25           30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
          35           40           45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
          50           55           60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
65          70          75          80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
          85          90          95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
          100         105         110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
          115         120         125
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          130         135         140

```

<210> 19

<211> 142

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DMS7151

<400> 19

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Thr Gly Leu Glu Pro
          20           25           30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
          35           40           45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
          50           55           60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
65          70          75          80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
          85          90          95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
          100         105         110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
          115         120         125
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          130         135         140

```

<210> 20

<211> 142

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DMS7152

<400> 20

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1           5           10           15

```

```

Gln Ala Ala Ser Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Val Asp Gly Gly Pro
      20      25      30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
      35      40      45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
      50      55      60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
      65      70      75      80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
      85      90      95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
      100      105      110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
      115      120      125
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      130      135      140

```

<210> 21
 <211> 142
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DMS7161

```

<400> 21
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
  1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Asp Leu Val Glu Gly Arg Gly Pro
      20      25      30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
      35      40      45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
      50      55      60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
      65      70      75      80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
      85      90      95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
      100      105      110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Leu Arg His
      115      120      125
Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      130      135      140

```

<210> 22
 <211> 108
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DOM7h-14-10 Аминокислотная последовательность

```

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln
      20      25      30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Leu Arg His Pro Lys
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 23

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> DOM7h-14-10 Нуклеотидная последовательность

<400> 23

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
gggaaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cggttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtttgaggc atcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Единичный вариабельный домен иммуноглобулина, специфически связывающий сывороточный альбумин человека, где указанный единичный вариабельный домен иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

2. Выделенный устойчивый к протеазе полипептид, связывающий сывороточный альбумин человека, где указанный полипептид содержит GLP-1, связанный с единичным вариабельным доменом иммуноглобулина по п.1 посредством линкера с аминокислотной последовательностью PSS, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

3. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует единичный вариабельный домен иммуноглобулина по п.1.

4. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует выделенный полипептид по п.2.

5. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.3, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:23.

6. Вектор экспрессии, включающий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.3 или 4.

7. Клетка-хозяин для экспрессии единичного вариабельного домена иммуноглобулина по п.1 или выделенного устойчивого к протеазе полипептида по п.2, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по п.3 или 4 или вектор по п.6.

8. Клетка-хозяин по п.7, где указанной клеткой является клетка вида *Pichia*.

Последовательность 1 (SEQ ID NO: 11);

DMS7190

HGEGTFTSDVSSYSEEA AAKEFIAWLVKGRGKEAAAKELAADIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKW

Последовательность 2 (SEQ ID NO: 12);

DMS7191

HGEGTFTSDGADLLEGQA AAKEFIAWLVKGRGKEAAAKELAADIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

Последовательность 3 (SEQ ID NO: 13);

DMS7192

HGEGTFTSDVATACEGQA AAKEFIACLVKGRGKEAAAKEAAAKEAAAKELA
ADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIM
WRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFG
QGTKVEIKR

Последовательность 4 (SEQ ID NO: 14);

DMS7193

HGEGTFTSDVSSYLEGQA AAKEFIAWLVTGLEREAAAKEAAAKELAADIQM
TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKV
EIKR

Фиг. 1

Последовательность 5 (SEQ ID NO: 15);

DMS7194

HGEGTFTSEFVTYLEGQAAKEFIAWLVKGKEAAAKELAADIQMTQSPSSL
SASVGDRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKW

Последовательность 6 (SEQ ID NO: 16);

DMS7148

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIADLVEGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Последовательность 7 (SEQ ID NO: 17);

DMS7149

HGEGTFTSEFVTYLEGQAAKEFIAWLVKGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Последовательность 8 (SEQ ID NO: 18);

DMS7150

HGEGTFTSDVSSYLEGMTSREFIAWLVKGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Последовательность 9 (SEQ ID NO: 19);

DMS7151

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVTGLEPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Последовательность 10 (SEQ ID NO: 20);

DMS7152

HGEGTFTSDVSSYLEGQAASEFIAWLVDGGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

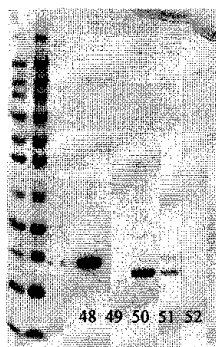
Последовательность 11 (SEQ ID NO: 21);

DMS7161

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIADLVEGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT
CRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

Фиг. 1 продолжение

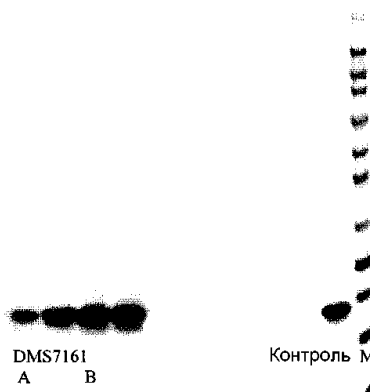
026508



Фиг. 2

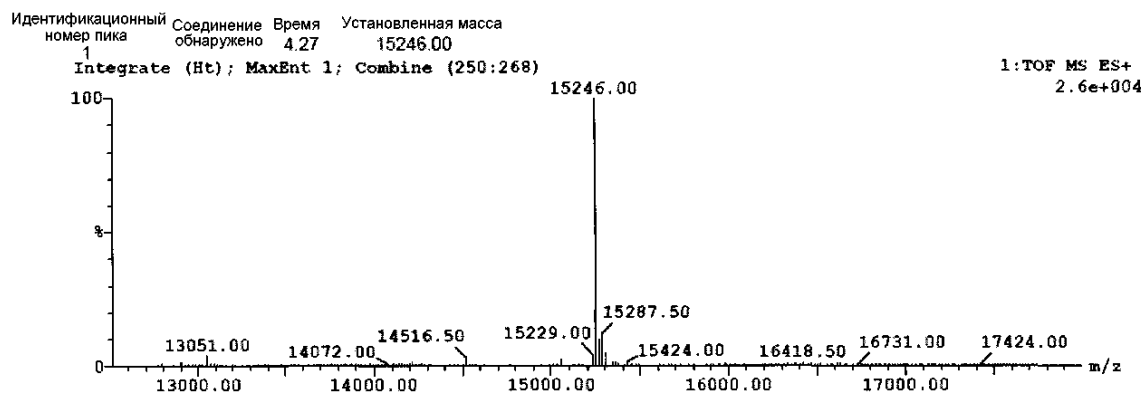


Фиг. 3



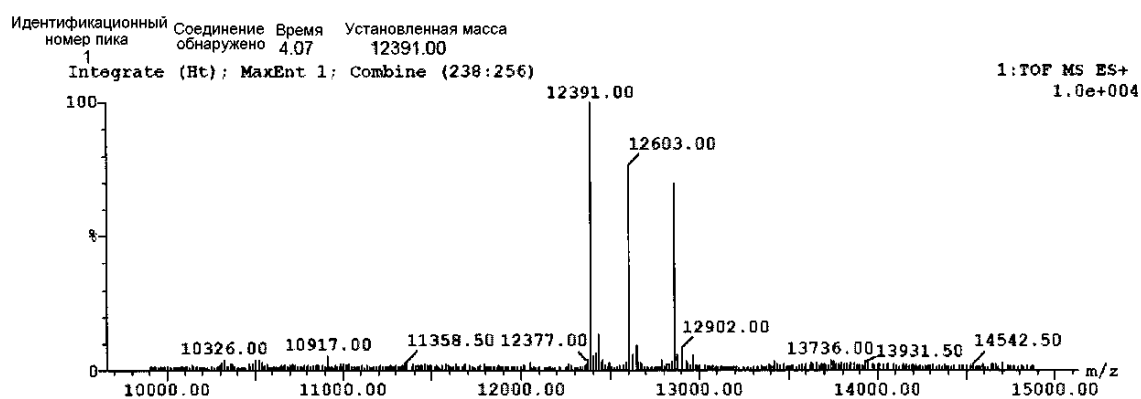
Фиг. 4

a) DMS7148 (Вариант6)

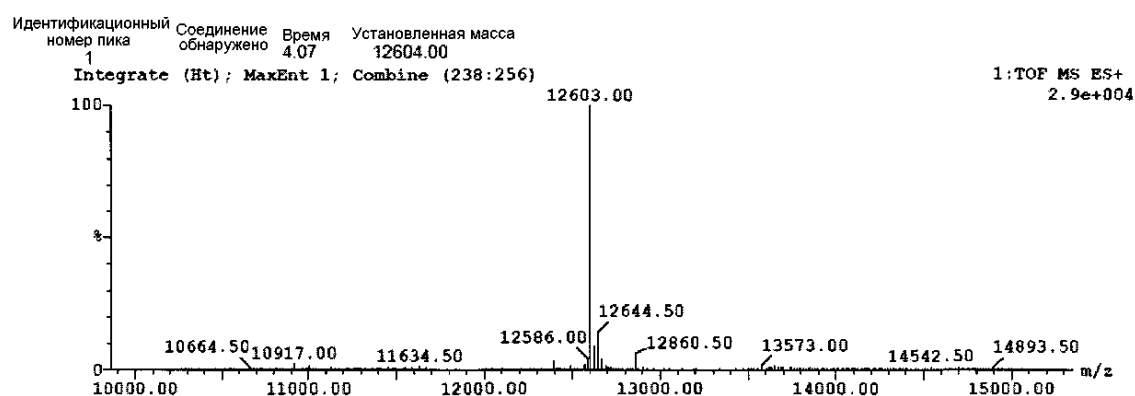


Фиг. 5

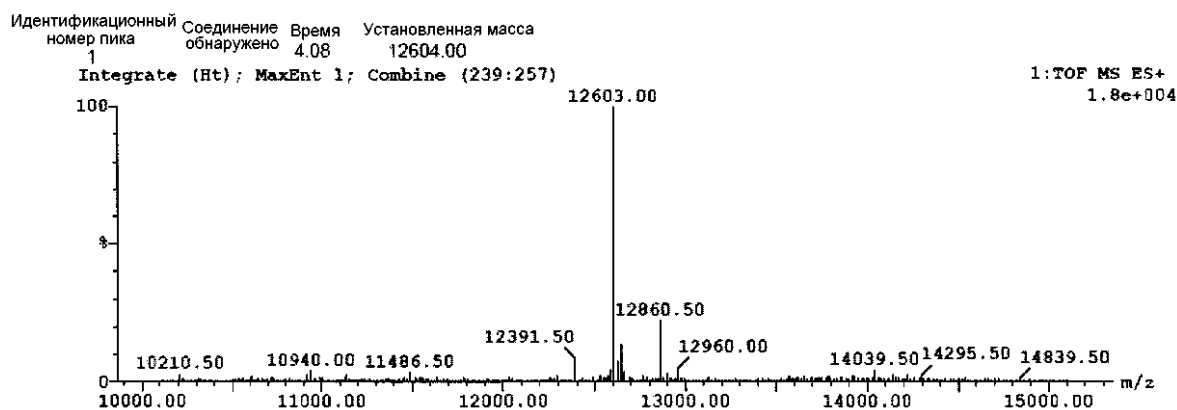
b) DMS7149 (Вариант 7)



c) DMS7150 (Вариант 8)

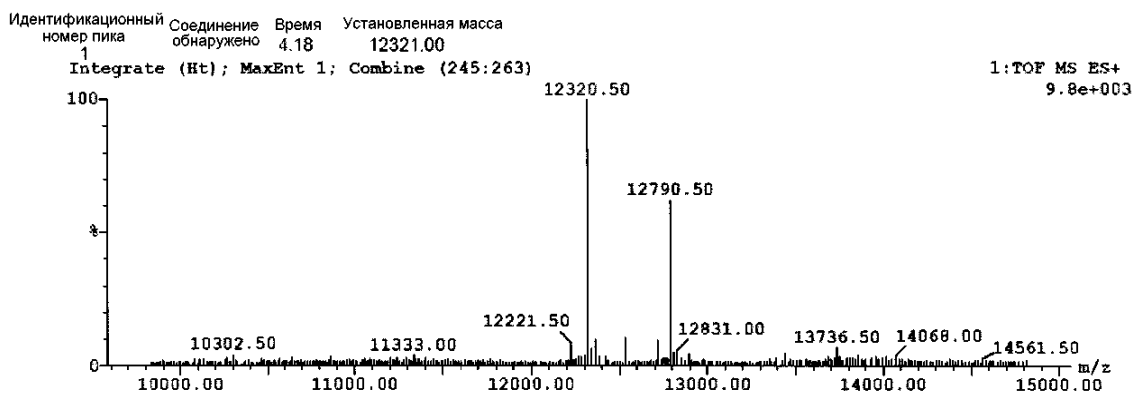


d) DMS7151 (Вариант 9)

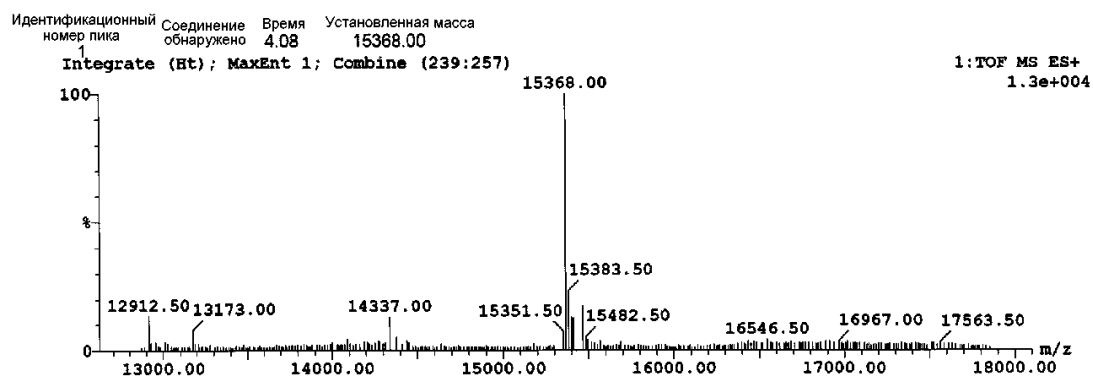


Фиг. 5 продолжение

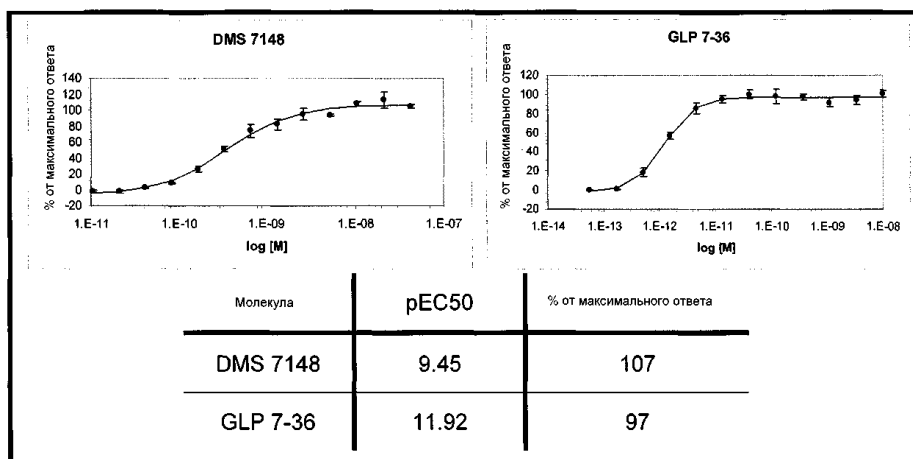
e) DMS7152 (Вариант10)



f) DMS7161 (Вариант11)

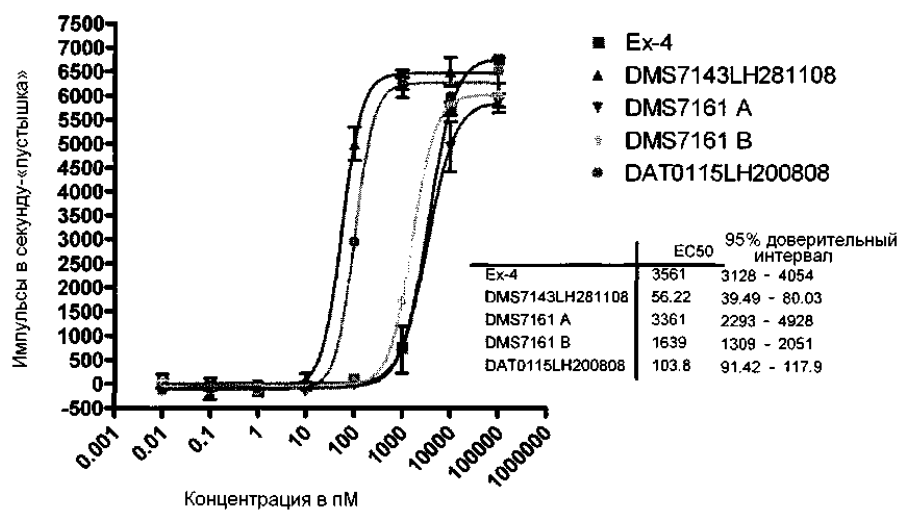


Фиг. 5 продолжение



Фиг. 6

Стимуляция клеток CHO с помощью GLP-1/Ex-4,
Анализ связывания DAT01 081128RDP



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2