

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037478**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.01

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890417

(22) Дата подачи заявки
2016.08.04

(54) **ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ВНУТРЕННЕ НЕУПОРЯДОЧЕННЫЕ
ПОЛИМЕРЫ-"НЕВИДИМКИ" ДЛЯ ДОСТАВКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/200,726**

(56) WO-A2-2011123813
US-A1-20110119778
US-A1-20130330335

(32) **2015.08.04**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/US2016/045655**

(87) **WO 2017/024182 2017.02.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЬЮК ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
**Чилкоти Ашутос, Банскота Самагия,
Юсефпур Париса, Бхатгачария
Джайанта (US)**

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

(57) В данном документе представлены конъюгаты, содержащие полипептид и одну или несколько молекул лекарственного средства. Полипептид содержит один или несколько заряженных мотивов и может дополнительно содержать один или несколько незаряженных мотивов. Конъюгаты можно применять для эффективной доставки субъекту молекулы лекарственного средства.

B1

037478

037478

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/200726, поданной 4 августа 2015 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Заявление, касающееся исследования, финансируемого из федерального бюджета

Настоящее изобретение было создано при поддержке правительства в рамках гранта 5R01EB000188 R01, присужденного Национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам доставки лекарственных средств и, более конкретно, к цвиттерионным полипептидам, конъюгированным с терапевтическими средствами. Конъюгаты характеризуются улучшенной биологической совместимостью и биоразлагаемостью. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты могут экспрессироваться рекомбинантным путем и, таким образом, их можно точно конструировать и подвергать манипуляциям на генном уровне.

Введение

Доставка лекарственных средств или терапевтических средств, таких как малые молекулы, пептиды и белки, в их нативной форме ограничена их недостаточной стабильностью, низкой растворимостью и коротким периодом циркуляции в крови *in vivo*. Эти проблемы с доставкой лекарственных средств приводят к снижению терапевтической эффективности и увеличению риска нецелевой токсичности. Благодаря присоединению макромолекулярных носителей к лекарственным средствам может улучшаться их растворимость, период полувыведения из плазмы крови, опухолеспецифическое поглощение и их общий терапевтический потенциал. Для доставки лекарственных средств ранее были сконструированы различные материалы, главным образом синтетические полимеры. Один такой синтетический полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG). PEG представляет собой гидрофильный и гигроскопичный полимер, образующий "водную оболочку" вокруг лекарственного средства, которая таким образом обеспечивает стерическое отталкивание от компонентов крови и предотвращает как его опсонизацию, так и ферментативное разрушение. Благодаря этому свойству "невидимости" PEG улучшается растворимость и стабильность лекарственных средств и снижается их преждевременное выведение из организма субъекта, что делает пегилирование - процесс присоединения лекарственных средств к PEG - важным способом в фармацевтической промышленности. В последние годы новый класс цвиттерионных синтетических полимеров, полимеры с чередующимися катионными и анионными группами в их мономере, продемонстрировал аналогичные свойства "невидимости". Тем не менее, существуют три основных недостатка, которые ставят под сомнение надежность синтетических полимеров в качестве средств доставки лекарственных средств. Во-первых, убедительно подтверждено документальными доказательствами, что повторяющееся воздействие PEG может вызывать образование PEG-специфичных антител, которые иницируют нежелательные иммунные ответы. Во-вторых, синтетические полимеры не являются биоразлагаемыми, и их эффект после доставки лекарственных средств *in vivo* не является в достаточной степени ясным. В-третьих, синтетические полимеры являются полидисперсными в том смысле, что каждая партия состоит из цепей с различными значениями молекулярной массы. Эта полидисперсность, внутренне присущая синтетическим полимерам, может приводить к получению группы конъюгатов лекарственных средств с различными биологическими свойствами, в частности, в отношении периода полувыведения и иммуногенности. В данной области техники существует необходимость в эффективной доставке лекарственных средств с улучшенными биологической совместимостью, растворимостью, стабильностью и периодом полувыведения, а также пониженной токсичностью.

Краткое описание

В одном аспекте в данном документе представлены конъюгаты, содержащие (а) полипептид, содержащий один или несколько заряженных мотивов, при этом каждый заряженный мотив независимо имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1 (VPX₁X₂G), где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту и где X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд; и (б) одну или несколько молекул лекарственного средства, присоединенных к полипептиду.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит множество заряженных мотивов. В некоторых вариантах осуществления множество заряженных мотивов повторяется тандемно. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит один или несколько незаряженных мотивов, при этом каждый незаряженный мотив независимо имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 3 (VPGXG), где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит множество незаряженных мотивов. В некоторых вариантах осуществления множество незаряженных мотивов повторяется тандемно. В некоторых вариантах осуществления один или несколько незаряженных мотивов расположены между по меньшей мере двумя смежными заряженными мотивами полипептида.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (VPX₁X₂G)_n, где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную

аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 $(VPGXG)_n$, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 $(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 $(VPGXG)_m(VPX_1X_2G)_n$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 $\{(VPX_1X_2G)(VPGXG)\}_b$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а b представляет собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, и при этом X_2 представляет собой положительно заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой положительно заряженную аминокислоту, и при этом X_2 представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженная аминокислота независимо выбрана из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженная аминокислота независимо выбрана из лизина и аргинина. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина. В некоторых вариантах осуществления X выбран из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана. В некоторых вариантах осуществления X выбран из глицина и валина.

В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит один или несколько цистеиновых остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: (GGC) , SEQ ID NO: $((GGC)_8)$, SEQ ID NO: $((G_4S)_3)$ и SEQ ID NO: $((VPGXG)_{16})$, где X представляет собой валин или цистеин, присутствующие в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления линкер расположен на C-конце, на N-конце или как на C-, так и на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько молекул лекарственного средства присоединены к полипептиду с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства присоединена к полипептиду посредством тиол-реактивной группы в линкере. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько молекул лекарственного средства выбраны из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, пептида, белка, углевода и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает белок. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает противораковое терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает антитело. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает паклитаксел. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает Tn3 (суперагонист TRAIL). В некоторых вариантах осуществления конъюгат получают для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления полипептид конъюгата экспрессируется рекомбинантным путем. В некоторых вариантах осуществления конъюгат экспрессируется рекомбинантным путем.

В другом аспекте в данном документе представлены композиции, содержащие конъюгат, подробно описанный в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлены полинуклеотиды, кодирующие полипептид, подробно описанный в данном документе. В другом аспекте в данном документе представлены полинуклеотиды, кодирующие конъюгат, подробно описанный в данном документе. В другом аспекте в данном документе представлены векторы, содержащие полинуклеотид.

В другом аспекте в данном документе представлены способы доставки субъекту молекулы лекарственного средства, при этом способ включает введение субъекту конъюгата, подробно описанного в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлены способы лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, при этом способ включает введение субъекту конъюгата, подробно описанного в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлены способы определения наличия мишени в образце, при этом способ включает приведение образца в контакт с конъюгатом, подробно описанным в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце; и выявление наличия комплекса, где наличие комплекса указывает на наличие мишени в образце.

В некоторых вариантах осуществления образец получают от субъекта, и способ дополнительно включает диагностику заболевания, прогнозирование или оценку эффективности лечения субъекта. В некоторых вариантах осуществления в случае, если способ дополнительно включает оценку эффективности лечения субъекта, способ дополнительно включает модификацию лечения субъекта в случае необходимости в улучшении эффективности. В другом аспекте в данном документе представлены способы диагностики заболевания у субъекта, при этом способ включает приведение образца от субъекта в контакт с конъюгатом, подробно описанным в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце; определение уровня мишени в образце, где уровень комплекса указывает на уровень мишени в образце; и сравнение уровня мишени в образце с контрольным уровнем мишени, где уровень мишени, отличный от контрольного уровня, указывает на заболевание у субъекта. В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень соответствует уровню у субъекта в момент времени до или в течение периода, в который субъект начал лечение, и где образец берут у субъекта в более поздний момент времени. В некоторых вариантах осуществления образец берут у субъекта в момент времени в течение периода, в который субъекта подвергают лечению, и при этом контрольный уровень соответствует уровню в отсутствие заболевания или уровню в момент времени до периода, в который субъект начал лечение. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает модификацию лечения или назначение другого вида лечения субъекту в случае, если данный вид лечения определяют как неэффективный при лечении заболевания. В некоторых вариантах осуществления конъюгат метят репортерной молекулой. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят субъекту внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным или внутриопухолевым путем. В некоторых вариантах осуществления конъюгат характеризуется пониженной антигенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG). В некоторых вариантах осуществления конъюгат характеризуется пониженной иммуногенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG). В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из рака, метаболического заболевания, аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и ортопедического нарушения. В некоторых вариантах осуществления заболевание включает рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака молочной железы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака легкого, рака предстательной железы, рака яичка, рака головного мозга, рака кожи, рака прямой кишки, рака желудка, рака пищевода, форм саркомы, рака трахеи, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака лимфатической системы, рака шейки матки, рака вульвы, меланомы, мезотелиомы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, рака костей, карциномы, саркомы и рака мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления рак включает рак молочной железы.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны возможные варианты архитектуры и последовательности ZiPP. (A) Гомополимер. (B) Диблок-полимер. (C) Мультиблочный полимер. (D) Возможные последовательности заряженного мотива.

На фиг. 2 показано получение характеристик ZiPP. Применяемые конструкции ZiPP представляли собой 120 повторов пентапептидных цвиттерионных мотивов. (A) Анализ очищенных конструкций ZiPP посредством SDS-PAGE. (B) Иллюстративные MALDI-спектры (VPKDG)₁₂₀ и (VPRDG)₁₂₀ подтверждали MW очищенных конструкций ZiPP (соответственно MW=60,5 кДа, MW=63,8 кДа). (C) Результаты измерения гидродинамического радиуса с помощью динамического светорассеяния демонстрировали хорошо гидратированные ZiPP по сравнению с контрольными ELP. (D) Спектры CD ZiPP демонстрировали отрицательную эллиптичность при малой длине волны и незначительную положительную эллиптичность при большей длине волны, что является типичным для неупорядоченной структуры, такой как у ELP. (E) Нативный PAGE в геле демонстрировал, что ZiPP не взаимодействовали с альбумином.

На фиг. 3 показаны фармакокинетические характеристики ELP (VPGAG) и ZiPP в плазме крови при внутривенной инъекции. (A) Схема эксперимента. (B) Значения концентрации в плазме крови в зависимости от времени, прошедшего после инъекции. (C) Площадь под кривой (AUC) для каждого конъюгата. (D) Период полувыведения для каждого конъюгата.

На фиг. 4 показаны фармакокинетические характеристики ELP (VPGAG) и ZiPP в плазме крови при подкожной инъекции. (A) Схема эксперимента. (B) Значения концентрации в плазме крови в зависимости от времени, прошедшего после инъекции. (C) AUC для каждого конъюгата.

На фиг. 5 показано получение характеристик конъюгата ZiPP-PTX. (A) Схема конструирования наночастиц ZiPP-паклитаксел (PTX). Паклитаксел конъюгировали химическим путем с 8 C-концевыми остатками с помощью pH-чувствительного линкера. (B) Данные динамического и статического светорассеяния после конъюгирования с PTX демонстрируют, что ZiPP самособираются в мицеллы радиусом 58

нм с числом агрегации 26 на мицеллу. Фактор формы (ρ), рассчитываемый как Rg/Rh , составлял 0,82, что означает образование сферических мицелл. MALDI-MS ZiPP и конъюгата ZiPP+PTX демонстрировала наличие 3,2-4 молекул лекарственных средств на полимерную цепь. (С) Жизнеспособность клеток в случае применения ZiPP-PTX, ELP-PTX и свободного PTX в линии раковых клеток молочной железы MDA-MB-231 с тройным негативным фенотипом после 72 ч обработки.

На фиг. 6 показаны ZiPP-илированные белки. (А) Общий вид конструкции слитого белка на основе ZiPP с (Tn3)6. (В) Анализ посредством SDS-PAGE подвергнутых аффинной очистке образцов (Tn3)6 с различными значениями длины ZiPP, которые экспрессировались рекомбинантным путем в *E. coli*. (С) Анализ цитотоксичности в отношении Co1o205 (раковых клеток толстой кишки) и расчетные значения IC50.

На фиг. 7 показано получение характеристик ZiPP. Применяемые конструкции ZiPP представляли собой 80 повторов пентапептидных цвиттерионных мотивов. (А) Анализ очищенных конструкций ZiPP посредством SDS-PAGE. Маркеры длин белков на 50 и 75 кДа отмечены в качестве эталонной молекулярной массы, однако маркеры длин белков, применяемые в SDS-PAGE, получены из глобулярных белков, и, следовательно, их нельзя непосредственно сравнивать с неструктурированными ZiPP. (В) Иллюстративные MALDI-спектры (VPREG)80 и (VPKEG)80 подтверждали молекулярную массу очищенных конструкций ZiPP (соответственно MW=44,1 кДа, MW=41,8 кДа). (С) Спектры CD ZiPP демонстрировали отрицательную эллиптичность при малой длине волны и незначительную положительную эллиптичность при большей длине волны, что является типичным для неупорядоченной структуры, такой как у ELP.

Подробное описание

В данном документе представлены композиции и способы для доставки молекул лекарственного средства субъекту. Композиции и способы включают конъюгат, содержащий полипептид и молекулу лекарственного средства, присоединенную к нему. Полипептид содержит как положительно, так и отрицательно заряженные аминокислоты. Композиции и способы, подробно описанные в данном документе, могут преодолевать существовавшие ранее проблемы с доставкой лекарственных средств, в том числе ограничения относительно биологической совместимости, растворимости, стабильности и периода полувыведения, иммуногенности и антигенности. В конструкциях, подробно описанных в данном документе, может использоваться принцип гидрофильности для обеспечения "водной оболочки" вокруг конъюгата для стерической защиты конъюгата от разрушения. Таким образом, конъюгаты увеличивают стабильность и растворимость конъюгированных терапевтических средств и улучшают их эффективность *in vivo*. Конъюгаты могут обеспечивать возможность лечения заболевания благодаря эффективной доставке лекарственных средств для лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления, в которых лекарственное средство связывается с мишенью, конъюгаты также можно применять для выявления мишени, выявления или диагностики заболевания и/или определения эффективности лечения. Конъюгаты, подробно описанные в данном документе, также могут быть получены с помощью генной инженерии, за счет чего облегчается их конструирование и манипуляция с ними с точностью, более низкой токсичностью, лучшей биологической совместимостью и улучшенной биоразлагаемостью.

1. Определения

Подразумевается, что термины "содержат(содержит)", "включают(включает)", "имеющий", "имеет", "может", "включает(включают)" и их варианты, используемые в данном документе, являются открытыми переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможность наличия дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Настоящее изобретение также охватывает другие варианты осуществления, "содержащие" варианты осуществления или элементы, представленные в данном документе, "состоящие из" них и "по сути состоящие из" них, независимо от того, изложены они явным образом или нет.

При упоминании в данном документе числовых диапазонов каждое промежуточное число в них охватывается явным образом с той же степенью точности. Например, в случае диапазона 6-9 в дополнение к 6 и 9 охватываются числа 7 и 8, а в случае диапазона 6,0-7,0 явным образом охватываются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в данной области техники. В случае противоречий данный документ, содержащий определения, будет иметь преимущественную силу. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылочные материалы, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

Термин "приблизительно", используемый в данном документе применительно к одному или нескольким значениям, представляющим интерес, относится к значению, близкому к указанному эталон-

ному значению. В определенных аспектах термин "приблизительно" относится к диапазону значений, находящихся в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или если иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

"Аминокислота", как используется в данном документе, относится к встречающимся в природе и неприродным синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающимся в природе аминокислотами являются аминокислоты, кодируемые генетическим кодом.

Аминокислоты могут называться в данном документе по их общеизвестным трехбуквенным символам либо по однобуквенным символам, рекомендованным Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аминокислоты содержат части, представляющие собой боковую цепь и полипептидный остов.

Используемый в данном документе термин "биомаркер" относится к встречающейся в природе биологической молекуле, присутствующей у субъекта в изменяющихся концентрациях, которая является пригодной в идентификации и/или классификации заболевания или состояния. Биомаркер может включать гены, белки, полинуклеотиды, нуклеиновые кислоты, рибонуклеиновые кислоты, полипептиды или другие биологические молекулы, применяемые в качестве индикатора или маркера заболевания. В некоторых вариантах осуществления биомаркер включает маркер заболевания. Например, биомаркер может представлять собой ген, экспрессия которого повышена или понижена у субъекта, имеющего заболевание. В качестве другого примера, биомаркер может представлять собой полипептид, уровень которого увеличен или уменьшен у субъекта, имеющего заболевание или риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления биомаркер включает малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления биомаркер включает полипептид.

Термины "контроль", "эталонный уровень" и "эталон" используются в данном документе взаимозаменяемо. Эталонный уровень может представлять собой предварительно определенное значение или диапазон, используемые в качестве стандарта, по которому оценивают результат измерения. "Контрольная группа", как используется в данном документе, относится к группе контрольных субъектов. Предварительно определенный уровень может представлять собой пороговое значение в контрольной группе. Предварительно определенный уровень может представлять собой среднее значение в контрольной группе. Пороговые значения (или предварительно определенные пороговые значения) можно определять по методике с использованием адаптивной индексной модели (AIM). Пороговые значения (или предварительно определенные пороговые значения) можно определять с помощью анализа кривых рабочих характеристик приемника (ROC) для биологических образцов, полученных от группы пациентов. Анализ ROC, общеизвестный в области биологии, заключается в определении способности теста выявлять различия между одним состоянием и другим, например, определять эффективность каждого маркера в идентификации пациента, имеющего CRC. Описание анализа ROC приведено в P.J. Heagerty et al. (Biometrics 2000, 56, 337-44), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В качестве альтернативы, пороговые значения можно определять с помощью квартильного анализа биологических образцов, полученных от группы пациентов. Например, пороговое значение можно определять путем выбора значения, которое соответствует любому значению в диапазоне от 25-го до 75-го перцентиля, предпочтительно значения, которое соответствует 25-му перцентилю, 50-му перцентилю или 75-му перцентилю, и более предпочтительно 75-му перцентилю. Такие статистические анализы можно выполнять с помощью любого способа, известного из уровня техники, и можно реализовывать с помощью любого количества коммерчески доступных пакетов программного обеспечения (например, от Analyse-it Software Ltd., Лидс, Великобритания; StataCorp LP, Колледж-Стейшен, Техас; SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина). Здоровые или нормальные уровни или диапазоны для мишени или для активности белка можно определять в соответствии с общепринятой практикой. Контролем может являться субъект или образец, полученный от него, для которого известен статус заболевания. Субъект или образец, полученный от него, может быть здоровым, пораженным заболеванием, пораженным заболеванием до лечения, пораженным заболеванием во время лечения или пораженным заболеванием после лечения или иметь комбинацию этих характеристик.

Термин "вектор экспрессии" указывает на плазмиду, вирус или другое средство, известное из уровня техники, в которое можно вставить или ввести последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую желаемый белок.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, восприимчивую к трансформации, трансфекции, трансдукции, конъюгации и т.п. с помощью конструкции нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии. Клетки-хозяева могут быть получены из растений, бактерий, дрожжей, грибов, насекомых, животных и т.п. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает *Escherichia coli*.

"Монодисперсный" или "монодисперсный" относятся к свойству множества конъюгатов или их полипептидов, где каждый из них имеет приблизительно одинаковую молекулярную массу. Генетически кодируемый синтез конъюгата может облегчать точный контроль молекулярной массы. Молекулярная

масса является фактором, который влияет на период циркуляции молекулы в крови *in vivo* или ее период полувыведения.

"Опсонизация" относится к молекулярному механизму, посредством которого молекулы, микроорганизмы или апоптотические клетки подвергаются химической модификации для усиления взаимодействий с рецепторами клеточной поверхности на фагоцитах и естественных клетках-киллерах (NK). Антиген на молекулах, микроорганизмах или апоптотической клетке покрыт опсонинами. Опсонины усиливают связывание с иммунными клетками, такими как макрофаги и нейтрофилы. Опсонизация также опосредует фагоцитоз посредством сигнальных каскадов от рецепторов клеточной поверхности.

"Синтетический полимер" относится к полимеру, получаемому по меньшей мере из одного мономера в ходе химического процесса. Синтетический полимер не продуцируется непосредственно в живом организме. Синтетические полимеры включают гомополимер, гетерополимер, блок-полимер, сополимер, тройной сополимер и т.п., а также их сочетания, комбинации и смеси. Примеры синтетических полимеров включают без ограничения функционализированные полимеры, такие как полимер, содержащий 5-винилтетразоловые мономерные звенья и имеющий распределение молекулярных масс менее 2,0. Синтетический полимер может представлять собой или содержать один или несколько звездчатых блок-сополимеров, линейных полимеров, разветвленных полимеров, гиперразветвленных полимеров, дендритных полимеров, гребенчатых полимеров, привитых полимеров, полимерных щеток, сополимеров типа "бутылочного ерша" и шитых структур, таких как блок-сополимер, содержащий блок из 5-винилтетразоловых мономерных звеньев. Синтетические полимеры включают без ограничения сложные полиэфиры, поли(мет)акриламиды, поли(мет)акрилаты, простые полиэфиры, полистиролы, полинорборнены и мономеры, имеющие ненасыщенные связи. Например, амфифильные гребенчатые полимеры описаны в публикации заявки на патент США № 2007/0087114 и в патенте США № 6207749, выданном Mayes et al., раскрытие каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Амфифильные гребенчатые полимеры могут присутствовать в форме сополимеров, содержащих остов, образованный гидрофобным водонерастворимым полимером, и боковые цепи, образованные короткими гидрофильными полимерами, не связывающимися с клетками. Примеры других синтетических полимеров включают без ограничения полиалкилены, такие как полиэтилен, и полипропилен, и полиэтиленгликоль (PEG); полихлоропрен; простые поливиниловые эфиры, такие как поли(винилацетат); поливинилгалогениды, такие как поли(винилхлорид); полисилоксаны; полистиролы; полиуретаны; полиакрилаты, такие как поли(метил(мет)акрилат), поли(этил(мет)акрилат), поли(н-бутил(мет)акрилат), поли(изобутил(мет)акрилат), поли(трет-бутил(мет)акрилат), поли(гексил(мет)акрилат), поли(изодецил(мет)акрилат), поли(лаурил(мет)акрилат), поли(фенил(мет)акрилат), поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат) и поли(октадецилакрилат); полиакриламиды, такие как поли(акриламид), поли(метаакриламид), поли(этилакриламид), поли(этил-метаакриламид), поли(N-изопропилакриламид), поли(н-, изо- и трет-бутилакриламид); а также их сополимеры и смеси. Эти синтетические полимеры могут включать пригодные производные, в том числе синтетические полимеры, имеющие замещенные, добавленные химические группы, например, алкильные группы, алкилиновые группы, гидроксилы, гидроксидирования, оксидирования и другие модификации, обычно выполняемые специалистами в данной области техники.

Синтетические полимеры могут включать цвиттерийные полимеры, такие как, например, полифосфорилхолин, поликарбоксиветаин и полисульфобетаин. Синтетические полимеры могут иметь бетаиновые, карбоксиветаиновые, сульфобетаиновые, олигоэтиленгликолевые (OEG), саркозиновые или полиэтиленгликолевые (PEG) боковые цепи.

"Полинуклеотид", как используется в данном документе, может быть однонитевым или двухнитевым или может содержать как двухнитевые, так и однонитевые части последовательности. Полинуклеотид может представлять собой природную или синтетическую нуклеиновую кислоту, ДНК, геномную ДНК, кДНК, РНК или гибридную молекулу, где полинуклеотид может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, и при этом комбинации оснований включают урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Полинуклеотиды можно получать с помощью способов химического синтеза или с помощью рекомбинантных способов.

"Пептид" или "полипептид" представляет собой соединенную последовательность из двух или более аминокислот, соединенных пептидными связями. Полипептид может быть природным, синтетическим или модификацией или комбинацией природного и синтетического. Пептиды и полипептиды включают белки, такие как связывающие белки, рецепторы и антитела. Термины "полипептид", "белок" и "пептид" используются в данном документе взаимозаменяемо. "Первичная структура" относится к аминокислотной последовательности конкретного пептида.

"Вторичная структура" относится к локально упорядоченным трехмерным структурам в полипептиде. Эти структуры общеизвестны как домены, например, ферментативные домены, внеклеточные домены, трансмембранные домены, поровые домены и цитоплазматические хвостовые домены. Домены представляют собой части полипептида, которые образуют компактную структурную единицу полипептида и обычно имеют длину от 15 до 350 аминокислот. Иллюстративные домены включают домены с ферментативной активностью или лигандсвязывающей активностью. Типичные домены образованы сег-

ментами более низкого уровня организации, такими как бета-листовые и альфа-спиральные фрагменты. "Третичная структура" относится к полной трехмерной структуре мономера полипептида. "Четвертичная структура" относится к трехмерной структуре, образованной путем нековалентного связывания независимых структурных единиц с третичной структурой. "Мотив" представляет собой часть полипептидной последовательности и содержит по меньшей мере две аминокислоты. Мотив может иметь длину от 2 до 20, от 2 до 15 или от 2 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мотив содержит 3, 4, 5, 6 или 7 последовательных аминокислот.

"Фармакокинетические характеристики", как используется в данном документе, относится к циркуляции лекарственных средств в организме и их биодоступности, распределению и экскреции.

"Рекомбинантный" при использовании в отношении, например, клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичных нуклеиновой кислоты или белка или изменения нативных нуклеиновой кислоты или белка или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, не обнаруживаемые в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в иных обстоятельствах характеризуются аномальной экспрессией, недостаточной экспрессией или вовсе не экспрессируются.

"Репортер", "репортерная группа", "метка" и "выявляемая метка" используются в данном документе взаимозаменяемо. Репортер способен генерировать выявляемый сигнал. Метка может генерировать сигнал, выявляемый визуальными или инструментальными средствами. Можно применять ряд репортерных групп, различающихся по физической природе передачи сигнала (например, флуоресцентная, электрохимическая, с использованием ядерного магнитного резонанса (NMR) и электронного парамагнитного резонанса (EPR)) и по химической природе репортерной группы. Различные репортеры включают вещества, генерирующие сигнал, такие как хромогены, флуоресцентные соединения, хемилюминесцентные соединения, радиоактивные соединения и т.п. В некоторых вариантах осуществления репортер включает радиоактивную метку. Репортеры могут включать фрагменты, генерирующие свет, например соединения акридиния, и фрагменты, генерирующие флуоресцентное излучение, например флуоресцеин. В некоторых вариантах осуществления сигнал от репортера представляет собой флуоресцентный сигнал. Репортер может включать флуорофор. Примеры флуорофоров включают без ограничения акрилодан (6-акрилоил-1-2-диметиламинафталин), бадан (6-бромацетил-2-диметиламинафталин), родамин, нафталин, дансилазиридин, сложный эфир 4-[N-[(2-йодацетокси)этил]-N-метиламино]-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазола (IANBDE), 4-[N-[(2-йодацетокси)этил]-N-метиламино-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол (IANBDA), флуоресцеин, дифторид бордипиррометена (BODIPY), 4-нитробензо[с][1,2,5]оксадиазол (NBD), флуоресцентные красители Alexa и их производные. Производные флуоресцеина могут включать, например, 5-флуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин, 3'6-карбоксифлуоресцеин, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, 6-гесахлорфлуоресцеин, 6-тетрахлорфлуоресцеин, флуоресцеин и изотиоцианат.

"Образец" или "тестовый образец", как используется в данном документе, может означать любой образец, в котором следует выявить или определить наличие и/или уровень мишени. Образцы могут включать жидкости, растворы, эмульсии или суспензии. Образцы могут включать медицинский образец. Образцы могут включать любую биологическую жидкость или ткань, такую как кровь, цельная кровь, фракции крови, такие как плазма крови и сыворотка крови, мышца, интерстициальная жидкость, пот, слюна, моча, слезная жидкость, синовиальная жидкость, костный мозг, спинномозговая жидкость, носовой секрет, мокрота, амниотическая жидкость, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, промывные воды желудка, рвотные массы, каловые массы, легочная ткань, моноклеарные клетки периферической крови, общая популяция лимфоцитов, клетки лимфатических узлов, клетки селезенки, клетки миндалин, раковые клетки, опухолевые клетки, желчь, пищеварительные соки, кожа или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления образец содержит аликвоту. В других вариантах осуществления образец содержит биологическую жидкость. Образцы можно получать любыми способами, известными из уровня техники. Образец можно использовать непосредственно после получения от пациента или можно подвергнуть предварительной обработке, как, например, путем фильтрации, дистилляции, экстракции, концентрирования, центрифугирования, инактивации мешающих компонентов, добавления реагентов и т. п., для модификации характеристики образца некоторым образом, как обсуждается в данном документе или, в ином случае, как известно из уровня техники.

Термин "чувствительность", используемый в данном документе, относится к числу истинно положительных результатов, деленному на число истинно положительных результатов, к которому прибавлено число ложноотрицательных результатов, где чувствительность ("чувств.") может находиться в пределах диапазона $0 < \text{чувств.} < 1$. В оптимальном случае варианты осуществления способа, приведенные в данном документе, характеризуются числом ложноотрицательных результатов, равным нулю или близким к нулю, так что ни один субъект не идентифицируется неверно как не имеющий заболевания, если на самом деле он имеет заболевание. В то же время часто делают оценку способности алгоритма предсказания правильно классифицировать отрицательные результаты, что является мерой, дополняющей чувствительность.

Термин "специфичность", используемый в данном документе, относится к числу истинно отрица-

тельных результатов, деленному на число истинно отрицательных результатов, к которому прибавлено число ложноположительных результатов, где специфичность ("специф.") может находиться в пределах диапазона $0 < \text{специф.} < 1$. В оптимальном случае способы, описанные в данном документе, характеризуются числом ложноположительных результатов, равным нулю или близким к нулю, так что ни один субъект не идентифицируется неверно как имеющий заболевание, если в действительности он не имеет заболевания. Следовательно, способ, у которого как чувствительность, так и специфичность равны одному или 100%, является предпочтительным.

Под "специфичным связыванием" обычно подразумевается, что полипептид связывается с мишенью таким образом, что он связывается с этой мишенью более легко, чем если бы он связывался со случайной неродственной мишенью.

"Невидимка" или "полимер-невидимка" относится к конъюгату или к его полипептиду, которые могут оставаться невыявленными иммунными клетками в кровотоке в течение продолжительного периода времени. Полимеры-"невидимки" являются, по меньшей мере, частично устойчивыми к ферментативному разрушению конъюгата или его полипептида, как, например, под действием протеаз и опсонизации, которая является распространенным способом, используемым иммунной системой для распознавания чужеродных частиц. Соответственно полимеры-"невидимки" могут характеризоваться одним или несколькими из пониженной антигенности, пониженной иммуногенности, увеличенной стабильности, увеличенного периода полувыведения и увеличенной биодоступности по сравнению с другими полимерами, конъюгатами, полимерами, не являющимися "невидимками", и/или конъюгатами, не являющимися "невидимками". Способность задерживать, снижать или предотвращать опсонизацию, распознавание иммунной системой или выведение из организма конъюгата (или его полипептида или молекул лекарственного средства) может называться в данном документе свойством "невидимости".

"Субъект", как используется в данном документе, может означать млекопитающее, которое желает получить описанные в данном документе конъюгаты или слитые белки или нуждается в их получении. Субъектом может являться человек или животное, отличное от человека. Субъектом может являться млекопитающее. Млекопитающее может являться приматом или животным, отличным от примата. Млекопитающее может являться приматом, таким как человек; животным, отличным от примата, таким как, например, собака, кошка, лошадь, корова, свинья, мышь, крыса, верблюд, лама, коза, кролик, овца, хомяк и морская свинка; или приматом, отличным от человека, таким как, например, обезьяна, шимпанзе, горилла, орангутан и гиббон. Субъект может иметь любой возраст или находиться на любой стадии развития, как, например, быть взрослым, подростком или ребенком.

"Мишень", как используется в данном документе, может относиться к объекту, с которым связывается молекула лекарственного средства. Мишень может включать, например, малую молекулу, белок, полипептид, полинуклеотид, углевод или их комбинацию.

"Переход" или "фазовый переход" относится к агрегации термочувствительных полипептидов. Фазовый переход происходит резко и обратимо при определенной температуре, называемой нижней критической температурой растворения (LCST) или температурой обратного перехода T_t . Ниже температуры перехода термочувствительный полипептид (или полипептид, содержащий термочувствительный полипептид) является высокорастворимым. При нагревании до температуры выше температуры перехода термочувствительные полипептиды подвергаются гидрофобному разрушению и агрегируют, образуя отдельную гелеобразную фазу. "Проведение цикла обратных переходов" относится к способу очистки белков, применяемому для термочувствительных полипептидов (или полипептида, содержащего термочувствительный полипептид). Способ очистки белков может предусматривать использование поведения обратимого фазового перехода термочувствительного полипептида для циклического прохождения раствора через растворимую и нерастворимую фазы, за счет чего осуществляется удаление загрязняющих веществ.

"Лечение" или "осуществление лечения" при ссылке на защиту субъекта от заболевания означает предупреждение, подавление, сдерживание, уменьшение интенсивности или полное устранение заболевания. Предупреждение заболевания предусматривает введение композиции по настоящему изобретению субъекту до появления заболевания. Подавление заболевания предусматривает введение композиции по настоящему изобретению субъекту после индуцирования заболевания, но до появления его клинических симптомов. Сдерживание или уменьшение интенсивности заболевания предусматривает введение композиции по настоящему изобретению субъекту после появления клинических симптомов заболевания.

"Практически идентичный" может означать, что первая и вторая аминокислотные последовательности характеризуются по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью на участке из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 аминокислот.

"Вариант", как используется в данном документе в отношении полинуклеотида, означает (i) часть или фрагмент эталонной нуклеотидной последовательности; (ii) последовательность, комплементарную эталонной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) полинуклеотид, практически идентичный эталонному полинуклеотиду или комплементарной ему последовательности или (iv) полинуклеотид, который гибридизируется в жестких условиях с эталонным полинуклеотидом, последовательностью, ком-

плементарной ему, или последовательностями, практически идентичными им.

"Вариант" может дополнительно быть определен как пептид или полипептид, который благодаря вставке, делеции или консервативной замене аминокислот отличается по аминокислотной последовательности, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Иллюстративные примеры "биологической активности" включают способность связываться с конкретным антигеном или полипептидом или стимулировать иммунный ответ. Вариант может означать практически идентичную последовательность. Вариант может означать ее функциональный фрагмент. Вариант также может означать несколько копий полипептида. Несколько копий могут располагаться тандемно или быть разделены линкером. Вариант также может означать полипептид с аминокислотной последовательностью, практически идентичной аминокислотной последовательности эталонного полипептида, который сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. В данной области техники признается, что консервативная замена аминокислоты, т.е. замена аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, относительным количеством и распределением заряженных участков), обычно предусматривает незначительное изменение. Эти незначительные изменения можно частично идентифицировать, рассматривая индекс гидропатичности аминокислот. См. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105-132. Индекс гидропатичности аминокислоты определяется на основании рассмотрения гидрофобности и заряда. Из уровня техники известно, что аминокислоты со сходными индексами гидропатичности можно заменять, и при этом по-прежнему будет сохраняться функция белка. В одном аспекте заменяют аминокислоты, имеющие значения индексов гидропатичности, составляющие ± 2 . Гидрофобность аминокислот также можно использовать для выявления замен, которые в результате будут давать полипептиды, сохраняющие биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот применительно к полипептиду позволяет произвести расчет наибольшей локальной средней гидрофильности этого полипептида, пригодной меры, которая согласно сообщениям хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью, как обсуждается в патенте США № 4554101, в полном объеме, включенном в данный документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может в результате давать полипептиды, сохраняющие биологическую активность, например, иммуногенность, как это понимается в данной области техники. Замены можно производить с аминокислотами, разность значений гидрофильности между которыми находится в пределах ± 2 . Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретная боковая цепь этой аминокислоты. Сообразно этому наблюдению понимают, что совместимость аминокислотных замен с биологической функцией зависит от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, выявляемого на основании гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и других свойств.

Вариант может представлять собой полинуклеотидную последовательность, практически идентичную по всей длине полной последовательности гена или ее фрагмента. Полинуклеотидная последовательность может характеризоваться 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентичностью по всей длине последовательности гена или ее фрагмента. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, практически идентичную по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента. Аминокислотная последовательность может характеризоваться 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

"Водная оболочка" относится к молекулам воды, окружающим молекулу и вступающим в ионные взаимодействия с молекулой. Молекула может представлять собой, например, полипептид, ZiPP, молекулу лекарственного средства или конъюгат. Если, например, молекула находится в растворе, то между молекулой и окружающими молекулами воды образуются ионные взаимодействия, так что вокруг нее образуется водная оболочка. Например, между положительно и отрицательно заряженными аминокислотами полипептида и молекулами воды вокруг него в растворе могут образовываться ионные взаимодействия. Раствор может включать, например, плазму крови или кровь или другую биологическую жидкость субъекта. Ионные взаимодействия являются более сильными, чем водородные связи или другие силы межмолекулярного притяжения, и для их нарушения необходимо больше энергии. В некоторых вариантах осуществления водная оболочка может защищать молекулу (например, полипептид, ZiPP, молекулу лекарственного средства или конъюгат) от разрушения или опсонизации. Водная оболочка может придавать молекуле свойство "невидимости".

"Цвиттерионный" или "цвиттер-ион" относится к молекуле, суммарный заряд которой равен нулю, но которая содержит отрицательные и положительные заряды на отдельных независимых атомах в молекуле. Заряженные атомы соединены одной или несколькими ковалентными связями. Полипептид может быть цвиттерионным.

2. Конъюгат

Конъюгат содержит полипептид и одну или несколько молекул лекарственного средства, присоединенных к полипептиду. Конъюгат может дополнительно содержать по меньшей мере один линкер. Конъюгаты рассматриваются как полимеры-"невидимки" для доставки лекарственных средств.

а) Полипептид

Полипептид содержит один или несколько заряженных мотивов. Заряженный мотив содержит одну или несколько положительно заряженных аминокислот и одну или несколько отрицательно заряженных аминокислот, где положительно заряженные аминокислоты и отрицательно заряженные аминокислоты присутствуют в соотношении 1:1. В некоторых вариантах осуществления суммарный заряд мотива является нейтральным. В некоторых вариантах осуществления заряженный мотив представляет собой цвиттерионный мотив. Положительно заряженные аминокислоты в одном мотиве могут быть одинаковыми или разными. Отрицательно заряженные аминокислоты в одном мотиве могут быть одинаковыми или разными. Как используется в данном документе, заряд аминокислоты (положительный и/или отрицательный) относится к заряду боковой цепи аминокислоты. Заряженная аминокислота является положительно и/или отрицательно заряженной при нейтральном значении рН, при физиологическом значении рН или при локальном значении рН в складке белка или при их комбинации. Заряженный мотив может дополнительно содержать одну или несколько незаряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления заряженный мотив имеет аминокислотную последовательность VPX_1X_2G (SEQ ID NO: 1), где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, и где X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд. Полипептид, содержащий один или несколько заряженных мотивов, может представлять собой цвиттерионный полипептид (ZiPP). ZiPP представляют собой в целом нейтральные полипептиды, которые содержат как аминокислоты с отрицательным зарядом, так и аминокислоты с положительным зарядом.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит множество заряженных мотивов. Множество заряженных мотивов может быть повторяющимся. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность $(VPX_1X_2G)_n$ (SEQ ID NO: 2), где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше. X_1 в смежных мотивах могут быть одинаковыми или разными. X_2 в смежных мотивах могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, меньшее или равное приблизительно 100, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 10, 50, 100, 150 или 200 или больше. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 10 до приблизительно 500, от приблизительно 10 до приблизительно 200, от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 10 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 500, от приблизительно 1 до приблизительно 200, от приблизительно 1 до приблизительно 100 или от приблизительно 1 до приблизительно 50. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495 или 500. В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность $(VPX_1X_2G)_n$ (SEQ ID NO: 2), где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше, может называться гомополимером.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит один или несколько незаряженных мотивов в дополнение к одному или нескольким заряженным мотивам. Незаряженный мотив содержит незаряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления незаряженный мотив не содержит какие-либо заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления незаряженный мотив имеет аминокислотную последовательность, состоящую из $VPGXG$ (SEQ ID NO: 3), где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина.

Множество незаряженных мотивов может повторяться тандемно. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность $(VPGXG)_n$ (SEQ ID NO: 4) в дополнение к одному или нескольким заряженным мотивам, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, меньшее или равное приблизительно 100, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 10, 50, 100, 150 или 200 или больше. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 10 до приблизительно 500, от приблизительно 10 до приблизительно 200, от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 10 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 500, от приблизительно 1 до приблизительно 200, от приблизительно 1 до приблизительно 100 или от приблизительно 1 до приблизительно 50. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495 или 500. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, содержащие незаряженный мотив, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из $(VPGXG)_n$ (SEQ ID NO: 4), в дополнение к одному или нескольким заряженным мотивам, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше, называются эластиноподобными полипептидами (ELP).

Мотивы полипептида могут быть расположены любым количеством возможных способов. Примеры возможных порядков расположения и архитектур показаны на фиг. 1. На фиг. 1 серый прямоугольник обозначает положительно заряженную аминокислоту, а черный прямоугольник обозначает отрицательно заряженную аминокислоту. На фиг. 1A показан пример гомополимера, в котором каждое звено представляет собой повторяющуюся последовательность пентапептида VPX_1X_2G (SEQ ID NO: 1), или заряженный мотив. На фиг. 1D показаны возможные последовательности VPX_1X_2G (SEQ ID NO: 1). На фиг. 1B показан пример диблок-полимера. В диблочной архитектуре один блок полимера образован повторяющимся заряженным мотивом, а другая часть содержит повторяющийся незаряженный мотив. На фиг. 1C показан пример мультиблочного полимера, в котором заряженные мотивы и незаряженные мотивы размещены в различных местах для увеличения разнообразия полимеров. Можно наметить конкретное количество, идентичность и порядок расположения мотивов для создания конъюгата, который может достигать оптимального уровня сольватации, создавать водную оболочку и/или создавать слой вокруг самого себя для содействия улучшению фармакокинетических характеристик терапевтических средств или молекул лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется порядком расположения, придающим полипептиду или конъюгату свойство "невидимости". В некоторых вариантах осуществления один или несколько незаряженных мотивов расположены между по меньшей мере двумя смежными заряженными мотивами полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит множество заряженных мотивов, повторяющихся тандемно, и множество незаряженных мотивов, повторяющихся тандемно. В некоторых вариантах осуществления множество заряженных мотивов, повторяющихся тандемно, расположено в С-концевом направлении от множества незаряженных мотивов, повторяющихся тандемно. В некоторых вариантах осуществления множество заряженных мотивов, повторяющихся тандемно, расположено в N-концевом направлении от множества незаряженных мотивов, повторяющихся тандемно.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность $(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$ (SEQ ID NO: 5), где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, меньшее или равное приблизительно 100, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 10, 50, 100, 150 или 200 или больше. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от приблизительно 10 до приблизительно 500, от приблизительно 10 до приблизительно 200, от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 10 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 500, от приблизительно 1 до приблизительно 200, от приблизительно 1 до приблизительно 100 или от приблизительно 1 до приблизительно 50. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, или 500. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число, меньшее или равное приблизительно 100, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 10, 50, 100, 150 или 200 или больше. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от приблизительно 10 до приблизительно 500, от приблизительно 10 до приблизительно 200, от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 10 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 500, от приблизительно 1 до приблизительно 200, от приблизительно 1 до приблизительно 100 или от приблизительно 1 до приблизительно 50. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число, равное приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470,

ное 1 или больше, может называться мультиблочным полимером.

В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, а X_2 представляет собой положительно заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления X_1 представляет собой положительно заряженную аминокислоту, а X_2 представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления отрицательно заряженная аминокислота независимо выбрана из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженная аминокислота независимо выбрана из лизина и аргинина. В некоторых вариантах осуществления X выбран из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана. В некоторых вариантах осуществления X выбран из глицина и валина.

В некоторых вариантах осуществления полипептид является чувствительным к температуре, что может также называться термочувствительностью. Термочувствительные полипептиды могут характеризоваться фазовым переходом. Термочувствительный полипептид может придавать полипептиду и/или конъюгату характеристику фазового перехода. Фазовый переход происходит резко и обратимо при определенной температуре, называемой нижней критической температурой растворения (LCST) или температурой обратного перехода (T_t). "Фазовый переход" или "переход" также может относиться к агрегации термочувствительного полипептида. Ниже температуры перехода (LCST или T_t) термочувствительные полипептиды (или полипептиды, содержащие термочувствительный полипептид) могут быть высокорастворимыми. При нагревании до температуры выше температуры перехода термочувствительные полипептиды могут подвергаться гидрофобному разрушению и агрегировать, образуя отдельную гелеобразную фазу или нерастворимые гидрофобные агрегаты. Свойство термочувствительности полипептида можно использовать при очистке полипептида и/или конъюгата в соответствии со способом, называемым "проведением цикла обратных переходов". Фазовый переход также можно инициировать с помощью космотропных солей, таких как, например, сульфат аммония. Вместе с космотропной солью можно использовать, например, хлорид натрия. Космотропную соль можно добавлять в раствор, содержащий полипептид и/или конъюгат, при этом космотропную соль добавляют до тех пор, пока полипептид и/или конъюгат не образует агрегаты или не выделится из раствора в виде осадка. Агрегаты можно осаждать путем центрифугирования и ресуспендировать во втором растворе или буфере. Агрегаты полипептида и/или конъюгата можно повторно солюбилизировать в растворе после охлаждения до температуры ниже их T_t или в случае, если космотропная соль удалена из раствора. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты очищают без какой-либо хроматографической очистки. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты получают рекомбинантным путем и очищают из бактериальной культуры, как, например, из *E. coli*.

b) Молекула лекарственного средства

Конъюгат может содержать одну или несколько молекул лекарственного средства. Молекула лекарственного средства может представлять собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства выбрана из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, белка, полипептида, углевода и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает белок. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает противораковое терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает антитело. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства включает $Tn3$ (суперагонист TRAIL). В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства присоединена к цистеиновому остатку полипептида конъюгата.

Конъюгат может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 молекул лекарственного средства. Конъюгат может содержать по меньшей мере приблизительно 1, по меньшей мере приблизительно 2 или по меньшей мере приблизительно 3 молекулы лекарственного средства. Конъюгат может содержать менее чем приблизительно 10, менее чем приблизительно 8 или менее чем приблизительно 5 молекул лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 1 молекулу лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 1 молекулу лекарственного средства на полипептид конъюгата. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 1-10 молекул лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит 2-5 молекул лекарственного средства.

c) Линкер

В некоторых вариантах осуществления конъюгат дополнительно содержит по меньшей мере один линкер. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит более одного линкера. В таких вариантах осуществления линкеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Конъюгат может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 линкеров. Конъюгат может содержать менее 20, менее 15, менее 10 или менее 5 линкеров. Конъюгат может содержать от 1 до 20, от 5 до 15 или от 1 до 5 линкеров. Линкер может быть расположен

на С-конце полипептида, на N-конце полипептида или как на N-, так и на С-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть расположен в любом месте в полипептидной последовательности. Несколько линкеров могут быть расположены смежными друг к другу.

Линкер может представлять собой полипептид с любой аминокислотной последовательностью и длиной. Линкер может выступать в качестве спейсерного пептида. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит незаряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит один или несколько цистеиновых остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8 (GGC), SEQ ID NO: 9 ((GGC)₈), SEQ ID NO: 10 ((G₄S)₃) и SEQ ID NO: 11 ((VPGXG)₁₆, где X представляет собой валин или цистеин, присутствующие в соотношении 1:1).

Линкер может служить местом присоединения молекулы лекарственного средства к полипептиду. Молекулу лекарственного средства можно присоединять к линкеру любыми подходящими способами, известными из уровня техники. Молекулу лекарственного средства можно присоединять к линкеру посредством тиол-реактивной линкерной группы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько молекул лекарственного средства присоединены к полипептиду с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства присоединена к полипептиду посредством тиол-реактивной группы в линкере.

3. Полинуклеотиды

Дополнительно представлены полинуклеотиды, кодирующие конъюгаты, подробно описанные в данном документе. Вектор может содержать полинуклеотид, кодирующий конъюгаты, подробно описанные в данном документе. Для достижения экспрессии полипептида можно субклонировать полинуклеотид, кодирующий полипептид, в вектор экспрессии, который содержит промотор для управления транскрипцией, терминатор транскрипции/трансляции и, в случае с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции. Примером вектора является рЕТ24. Подходящие бактериальные промоторы хорошо известны из уровня техники. Дополнительно представлена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, кодирующий конъюгат, подробно описанный в данном документе. Бактериальные системы экспрессии для экспрессии белка доступны, например, в *E. coli*, *Bacillus sp.* и *Salmonella* (Paiva et al., *Gene* 1983, 22, 229-235; Mosbach et al., *Nature* 1983, 302, 543-545). Наборы для таких систем экспрессии являются коммерчески доступными.

Эукариотические системы экспрессии для клеток млекопитающих, дрожжей и клеток насекомых хорошо известны из уровня техники и также являются коммерчески доступными. В настоящем изобретении можно применять ретровирусные системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 13.

Конъюгат можно экспрессировать рекомбинантным путем в клетке-хозяине в соответствии с представлениями специалиста в данной области техники. Конъюгат можно очищать любыми способами, известными специалисту в данной области техники. Например, конъюгат можно очищать с помощью хроматографии, такой как жидкостная хроматография, эксклюзионная хроматография или аффинная хроматография или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления конъюгат очищают без проведения хроматографии. В некоторых вариантах осуществления конъюгат очищают с помощью проведения цикла обратных переходов.

4. Введение

Композиция может содержать конъюгат. Конъюгаты, подробно описанные выше, можно составлять в виде композиции в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Композицию можно получать для введения субъекту. Такие композиции, содержащие конъюгат, можно вводить в дозах и с помощью методик, хорошо известных специалистам в области медицины, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, вес и состояние конкретного субъекта, а также путь введения.

Конъюгат можно вводить в целях профилактики или терапии. При профилактическом введении конъюгат можно вводить в количестве, достаточном для индуцирования ответа. При терапевтических применениях конъюгаты вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать терапевтический эффект. Надлежащее количество для осуществления этого определяется как "терапевтически эффективная доза". Количества, эффективные для данного пути применения, будут зависеть, например, от конкретного состава конъюгата, назначенного режима, способа введения, стадии и степени тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента, а также мнения лечащего врача.

Конъюгат можно вводить с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, которые описаны у Donnelly et al. (*Ann. Rev. Immunol.* 1997, 15, 617-648); Feigner et al. (патент США № 5580859, выданный 3 декабря 1996 г.); Feigner (патент США № 5703055, выданный 30 декабря 1997 г.) и Carson et al. (патент США № 5679647, выданный 21 октября 1997 г.), содержание всех из которых включено в дан-

ный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Конъюгат можно объединять в комплекс с частицами или гранулами, которые можно вводить индивидууму, например, с помощью шприца-пистолета для вакцинации. Специалисту в данной области техники должно быть известно, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого соединения, зависит, например, от пути введения.

Конъюгаты можно доставлять посредством ряда путей. Типичные пути доставки включают парентеральное введение, например, внутрикожную, внутримышечную или подкожную доставку. Другие пути включают пероральное введение, интраназальный, интравагинальный, чрескожный, внутривенный, внутриартериальный, внутриопухольный, внутрибрюшинный и эпидермальный пути. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят субъекту внутривенным, внутриартериальным или внутрибрюшинным путем.

Конъюгат может представлять собой жидкий препарат, такой как суспензия, сироп или эликсир. Конъюгат можно включить в состав липосом, микросфер или других полимерных матриц (как, например, с помощью способа, описанного Feigner et al., патент США № 5703055; Gregoriadis, *Liposome Technology*, Vol. I-III (2-ое изд. 1993), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Липосомы могут состоять из фосфолипидов или других липидов и могут представлять собой нетоксичные, физиологически приемлемые и метаболизируемые носители, которые являются относительно простыми в получении и введении.

Конъюгат можно применять в качестве вакцины. Вакцину можно вводить посредством электропорации, как, например, с помощью способа, описанного в патенте США № 7664545, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Электропорацию можно осуществлять с помощью способа и/или устройства, описанного в патентах США №№ 6302874; 5676646; 6241701; 6233482; 6216034; 6208893; 6192270; 6181964; 6150148; 6120493; 6096020; 6068650 и 5702359, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Электропорацию можно выполнять с помощью минимально инвазивного устройства.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят в составе с контролируемым высвобождением. Конъюгат может высвобождаться, например, в циркулирующую кровь или опухоль. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может высвобождаться в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 дня, по меньшей мере приблизительно 2 дней, по меньшей мере приблизительно 3 дней, по меньшей мере приблизительно 4 дней, по меньшей мере приблизительно 5 дней, по меньшей мере приблизительно 6 дней, по меньшей мере приблизительно 7 дней, по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 1,5 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель, по меньшей мере приблизительно 2,5 недели, по меньшей мере приблизительно 3,5 недели, по меньшей мере приблизительно 4 недель или по меньшей мере приблизительно 1 месяца.

5. Выявление

Используемый в данном документе термин "выявление" или "определение наличия" относится к качественному измерению невыявляемых, низких, нормальных или высоких концентраций одного или нескольких конъюгатов, связанных с мишенью. В некоторых вариантах осуществления мишень может представлять собой биомаркер. Выявление может включать выявление *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Выявление может включать выявление наличия одного или нескольких конъюгатов или мишеней в противоположность отсутствию одного или нескольких конъюгатов или мишеней. Выявление также может включать количественную оценку уровня одного или нескольких конъюгатов или мишеней. Термин "оценивать количественно" или "количественная оценка" можно использовать взаимозаменяемо, и они могут относиться к способу определения относительного или абсолютного количества или содержания вещества (например, конъюгата или мишени). Любой подходящий способ выявления находится в пределах общего объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит репортерную молекулу, присоединенную к нему для выявления. В некоторых вариантах осуществления конъюгат метят репортерной молекулой. В некоторых вариантах осуществления выявление конъюгата, связанного с мишенью, можно определять с помощью способов, включающих без ограничения определение интенсивности полосы в вестерн-блоттинге, проточную цитометрию, визуализацию с помощью радиоактивной метки, анализы связывания с клетками, анализы активности, SPR, иммунологический анализ, или с помощью различных других способов, известных из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления, в том числе в тех, в которых конъюгат содержит антитело для связывания и/или выявления мишени, можно использовать любой иммунологический анализ. Иммунологический анализ может представлять собой, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), анализ конкурентного ингибирования, такой как прямые или обратные анализы конкурентного ингибирования, флуоресцентный поляризационный анализ или анализ конкурентного связывания. ELISA может представлять собой "сэндвич"-ELISA. Специфичное иммунное связывание конъюгата с мишенью можно выявлять с помощью прямых меток, присоединенных к конъюгату, или с помощью не прямых меток, таких как щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена. В иммунологический анализ может быть включено применение иммобилизованных конъюгатов. Конъюгаты можно иммобилизовать на ряде подложек, таких как магнитные частицы или частицы хро-

матрицы, поверхность аналитического планшета (как, например, лунки титрационного микропланшета), кусочки материала твердого субстрата и т. п. Путем покрывания твердой подложки конъюгатом или множеством конъюгатов в виде упорядоченного набора можно получить аналитическую полосу. Эту полосу затем можно погрузить в тестируемый биологический образец и затем быстро обработать в ходе стадий промывания и выявления с генерированием поддающегося измерению сигнала, такого как окрашенное пятно.

6. Способы

а) Способы доставки молекулы лекарственного средства

Настоящее изобретение относится к способу доставки субъекту молекулы лекарственного средства. Способ может включать введение субъекту конъюгата, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конъюгат характеризуется улучшенным свойством по сравнению с молекулой лекарственного средства в отдельности или молекулой лекарственного средства, конъюгированной с синтетическим полимером, таким как полиэтиленгликоль (PEG), при этом улучшенное свойство выбрано, например, из "невидимости", биологической совместимости, растворимости, стабильности, периода полувыведения, времени удержания в плазме крови, антигенности, иммуногенности, монодисперсности или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления конъюгат легко синтезируют. В некоторых вариантах осуществления конъюгат легко очищают. В некоторых вариантах осуществления легкость синтеза и/или очистки может обуславливать улучшение соотношения затраты/эффективность для конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат или его полипептид является генетически кодируемым, за счет чего облегчается конструирование конъюгата с точной молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса конъюгата определяет его период полувыведения *in vivo* и/или влияет на него. Возможность легкого и точного контроля молекулярной массы конъюгата может облегчать контроль периода полувыведения конъюгата *in vivo*. Для сравнения, контроль молекулярной массы синтетических полимеров, таких как PEG, может не быть легким. В некоторых вариантах осуществления конъюгат характеризуется пониженной антигенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с синтетическим полимером, таким как полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления конъюгат характеризуется пониженной иммуногенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с синтетическим полимером, таким как полиэтиленгликоль (PEG).

б) Способы лечения заболевания

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Способ может включать введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в данном документе. Заболевание может представлять собой, например, рак, метаболическое заболевание, аутоиммунное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание или ортопедическое нарушение.

Метаболическое заболевание может наблюдаться в случаях, когда аномальные химические реакции в организме изменяют нормальный процесс метаболизма. Метаболические заболевания могут включать, например, инсулинорезистентность, неалкогольные жировые заболевания печени, сахарный диабет 2 типа, инсулинорезистентные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, артериосклероз, нарушения метаболизма липидов, гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию и нарушения метаболизма глюкозы.

Аутоиммунные заболевания обусловлены аномальным иммунным ответом организма на вещества и ткани, в обычных условиях присутствующие в организме. Аутоиммунные заболевания могут включать без ограничения волчанку, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, инсулинозависимый сахарный диабет, тяжелую миастению, болезнь Грейвса, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Гудпасчера, обыкновенную пузычатку, острую ревматическую лихорадку, постстрептококковый гломерулонефрит, узелковый полиартериит, миокардит, псориаз, целиакию, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и фибромиалгию.

Сердечно-сосудистые заболевания представляют собой класс заболеваний, поражающих сердце или кровеносные сосуды. Сердечно-сосудистые заболевания могут включать, например, заболевания коронарных артерий (CAD), такие как стенокардия и инфаркт миокарда (сердечный приступ), инсульт, гипертензивную кардиопатию, ревматическую болезнь сердца, кардиомиопатию, аритмию сердца, врожденный порок сердца, порок клапана сердца, кардит, аневризмы аорты, заболевание периферических артерий и венозный тромбоз.

Ортопедические нарушения или скелетно-мышечные нарушения представляют собой повреждения или боли в суставах, связках, мышцах, нервах, сухожилиях организма, а также структурах, которые поддерживают конечности, шею и спину. Ортопедические нарушения могут включать дегенеративные заболевания и воспалительные состояния, которые вызывают боль и ухудшают обычные виды деятельности. Ортопедические нарушения могут включать, например, синдром запястного канала, эпикондилит и тендинит.

Формы рака могут включать без ограничения рак молочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак легкого, рак предстательной железы, рак яичка, рак головного мозга, рак кожи, рак прямой кишки, рак желудка, рак пищевода, формы саркомы, рак трахеи, рак головы и шеи, рак поджелудоч-

ной железы, рак печени, рак яичника, рак лимфатической системы, рак шейки матки, рак вульвы, меланому, мезотелиому, рак почки, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы, формы рака костей, формы карциномы, формы саркомы и формы рака мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

с) Способы диагностики заболевания

В данном документе представлены способы диагностики заболевания. Способы могут включать введение субъекту конъюгата, описанного в данном документе, и выявление связывания конъюгата с мишенью для определения наличия мишени у субъекта. Наличие или отсутствие мишени может указывать на заболевание у субъекта. В других вариантах осуществления способы могут включать приведение образца от субъекта в контакт с конъюгатом, описанным в данном документе, определение уровня мишени в образце и сравнение уровня мишени в образце с контрольным уровнем мишени, где уровень мишени, отличный от контрольного уровня, указывает на заболевание у субъекта. В некоторых вариантах осуществления выявленные уровни мишени, меньшие, чем контрольный уровень, могут указывать на заболевание. В некоторых вариантах осуществления выявленные уровни мишени, превышающие контрольный уровень, могут указывать на заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из рака, метаболического заболевания, аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и ортопедических нарушений, подробно описанных выше. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит маркер заболевания или биомаркер.

d) Способы определения наличия мишени

В данном документе представлены способы определения наличия мишени в образце. Способы могут включать приведение образца в контакт с конъюгатом, описанным в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между конъюгатом и мишенью в образце, и выявление наличия комплекса. Наличие комплекса может указывать на наличие мишени в образце. Мишень может представлять собой, например, белок или нуклеиновую кислоту. Белок может представлять собой, например, рецептор или антиген. Антиген может, например, быть ассоциированным с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит биомаркер. В некоторых вариантах осуществления конъюгат метят репортерной молекулой для выявления.

В некоторых вариантах осуществления образец получают от субъекта, и способ дополнительно включает диагностику, прогнозирование или оценку эффективности лечения субъекта. Если способ включает оценку эффективности лечения субъекта, то способ может дополнительно включать модификацию лечения субъекта в случае необходимости в улучшении эффективности.

e) Способы определения эффективности лечения

В данном документе представлены способы определения эффективности лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Способы могут включать приведение образца от субъекта в контакт с конъюгатом, подробно описанным в данном документе, в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между конъюгатом и мишенью в образце, определение уровня комплекса в образце, где уровень комплекса указывает на уровень мишени в образце, и сравнение уровня мишени в образце с контрольным уровнем мишени, где в случае, если уровень мишени отличается от контрольного уровня, вид лечения определяют как эффективный или неэффективный при лечении заболевания.

Моменты времени могут включать моменты времени до появления заболевания, до применения терапии, различные моменты времени во время применения терапии и после завершения терапии или их комбинацию. При введении конъюгата субъекту конъюгат может связываться с мишенью, где наличие или отсутствие мишени указывает на наличие заболевания у субъекта в различные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления мишень содержит маркер заболевания или биомаркер. Сравнение связывания конъюгата с мишенью в различные моменты времени может указывать на то, прогрессирует ли заболевание, перешло ли заболевание в запущенную форму, является ли терапия действенной в лечении или предупреждении заболевания, или на комбинацию этого.

В некоторых вариантах осуществления контрольный уровень соответствует уровню у субъекта в момент времени до или в течение периода, в который субъект начал лечение, и образец берут у субъекта в более поздний момент времени. В некоторых вариантах осуществления образец берут у субъекта в момент времени в течение периода, в который субъекта подвергают лечению, и контрольный уровень соответствует уровню в отсутствие заболевания или уровню в момент времени до периода, в который субъект начал лечение. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает модификацию лечения или назначение другого вида лечения субъекту в случае, если данный вид лечения определяют как неэффективный при лечении заболевания.

7. Примеры

Пример 1.

Материалы и способы

Клонирование.

Гены, отвечающие за синтез ZiPP, собирали из химически синтезированных олигомеров (IDT Inc.; Коралвилль, Айова). Олигомеры клонировали в вектор экспрессии pET в *E. coli* с помощью методики рекурсивного направленного лигирования путем реконструкции плазмиды (PRe-RDL) (McDaniel, J.R., et

al. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 944-952).

Экспрессия и очистка ZiPP путем проведения цикла обратных переходов (ITC). ZiPP экспрессировали с вектора экспрессии pET в *E. coli*. Все ZiPP в водном растворе демонстрируют обратимый фазовый переход. Они переходят из состояния растворимого белка в состояние нерастворимых гидрофобных агрегатов при нагревании до температуры выше их температуры перехода (T_t). Эти же явления (разделение фаз) также можно инициировать с помощью космотропных солей. Агрегаты ZiPP можно повторно солубилизовать в растворе после охлаждения до температуры ниже их T_t или в случае, если соль удалена из раствора. Это свойство термочувствительности ZiPP обеспечивает простой хроматографический способ очистки белков. Данный способ очистки называют "проведением цикла обратных переходов" (ITC) (Meyer, D.E. and A. Chilkoti. *Nat. Biotech.* 1999, 17, 1112-1115; MacEwan, S.R., et al. *J. Vis. Exp.* 2014, 88, e51583).

В типичном варианте очистки ZiPP посредством ITC клетки *E. coli* извлекают из культуры объемом 1 л путем центрифугирования и ресуспендируют в холодном PBS. Клетки затем лизируют путем ультразвукового разрушения при 4°C. Лизат *E. coli* затем центрифугируют при 15000 × g с удалением клеточных стенок и другого клеточного дебриса. ZiPP представляют собой растворимые белки, присутствующие в растворимой фракции (надосадочной жидкости) клеточного лизата. К надосадочной жидкости клеточного лизата добавляют полиэтиленмин, и ее центрифугируют при 14000 × g для осаждения ДНК и любых оставшихся клеточных стенок бактерий. ZiPP затем очищают из надосадочной жидкости путем инициирования разделения фаз с помощью сульфата аммония и хлорида натрия с последующим центрифугированием при 15000 × g в течение 15 мин при 4°C. Осадок затем ресуспендируют в холодном PBS и любое нерастворимое вещество удаляют с помощью стадии центрифугирования при 4°C в течение 10 мин. Эти стадии повторяют до достижения однородности, которая подтверждается появлением одной полосы в геле для SDS-PAGE. Молекулярную массу (MW) также подтверждали с использованием устройства Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems; Фостер-Сити, Калифорния).

Неструктурированную природу ZiPP подтверждали с использованием устройства для измерения кругового дихроизма (Aviv 202). Для экспериментов на животных эндотоксин удаляют с помощью D-toxi-Gel (Thermo Scientific; Уолтем, Массачусетс).

Фармакокинетическое (PK) исследование *in vivo*. В данном исследовании ZiPP сравнивали с незаряженными полимерами (VPGAG)120 и (VPGAG)160. Полимеры метили флуоресцентным красителем Alexa 488 на N-конце и вводили мышам Balb/c посредством инъекции в хвостовую вену. VPGAG, биополимер аналогичной природы, но без каких-либо зарядов, применяли в качестве контроля, чтобы продемонстрировать, что любое наблюдаемое изменение фармакокинетических параметров обусловлено включением зарядов в мотив VPX1X2G. Каждая мышь получала однократную дозу ZiPP или контроля (150 мг/кг BW), инъецируемую *i.v* или подкожно. Образцы крови собирали (10 мкл собирали в пробирки со 100 мкл гепарина) из хвостовой вены через 40 с, 15 мин., 0,5, 2, 4, 8, 24, 48 и 72 ч после инъекции. Концентрацию меченного флуоресцентным красителем полимера в крови рассчитывали с помощью калибровочной кривой для Alexa 488. Данные временной динамики концентрации в крови анализировали с помощью стандартной двухкомпонентной PK-модели для данных PK-исследования с *i.v.* введением в целях установления фармакокинетических параметров.

Конъюгирование с паклитакселом (PTX). Восемь цистеиновых остатков, расположенных с регулярными промежутками в виде мотива (VPGXG)16, при этом x представляет собой V или C в соотношении 1:1, клонировали на C-конец ZiPP. Сегмент, используемый для конъюгирования с лекарственным средством, содержал восемь цистеиновых остатков, с которыми конъюгировали несколько копий PTX. Первый 2' OH PTX модифицировали леулиновой кислотой (Etrych T.S., et al. *Molecular Pharmaceutics* 2010, 7, 1015-1026). При данной модификации сохраняется цитотоксичность PTX. Активированный PTX затем конъюгировали со свободными тиольными группами с помощью кислотолabile гидролизного линкера (линкера на основе гидрозида N-ε-малеимидапроновой кислоты (EMCH)) с концевой малеимидной группой, которая вступала в реакцию с тиольными группами ZiPP с образованием стабильной углерод-серной связи (Andrew MacKay, J., et al. *Nat. Mater.* 2009, 8, 993-999).

Получение характеристик конъюгата лекарственного средства ZiPP-PTX. Чистоту конъюгата лекарственного средства оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Данные HPLC оценивали количественно с использованием интегрированной площади пика при поглощении при 228 нм, которое соответствует поглощению PTX. Соотношение конъюгирования лекарственных средств и ZiPP определяли с помощью устройства Voyager DE-Pro MALDI-MS (Applied Biosystems; Фостер-Сити, Калифорния) для времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS), оснащенного азотным лазером (337 нм). Для определения гидродинамического радиуса (Rh) наночастицы ZiPP-PTX при 25°C и концентрации 25 мкМ с помощью планшет-ридера DynaPro (Wyatt Technology; Санта-Барбара, Калифорния) использовали методику динамического светорассеяния (DLS). Данные анализировали с помощью регуляризационной аппроксимации автокорреляционной функции, и процентную интенсивность переводили в массовую интенсивность с помощью модели сфер Релея. Регуляризационную аппроксимацию затем применяли для опреде-

ления гидродинамического радиуса в виде взвешенного по массовому проценту значения для случайной спирали. Радиус инерции рассчитывали с использованием статического светорассеяния (SLS) после конъюгирования с РТХ. Фактор формы (ρ) рассчитывали как R_g/R_h .

Цитотоксичность конъюгатов ZiPP-РТХ *In vitro*. Исследование цитотоксичности *in vitro* проводили на раковых клетках молочной железы человека MDA-MB-231 с тройным негативным фенотипом. Высеивали 3×10^3 клеток на 100 мкл среды в 96-луночных планшетах для культуры клеток Falcon™ (BD; Франклин-Лейке, Нью-Джерси). Обеспечивали прилипание клеток в течение 16-18 часов перед обработкой свободным РТХ и ZiPP-РТХ в концентрациях в диапазоне от субнанолярных до высоких микромолярных. После 72 часов обработки лекарственным средством в каждую лунку добавляли 20 мкл реагента 3-(4,5-диметил-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолия (MTS) (CellTiter 96 AQueous™; Promega, Мэдисон, Висконсин) и инкубировали в течение дополнительных 2 ч. Кривую зависимости доза-эффект для свободного лекарственного средства и конъюгата ZiPP-лекарственное средство строили путем измерения поглощения в каждой лунке при 490 нм с помощью микропланшет-ридера Victor3 (Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс). 50% ингибирующую концентрацию IC50 определяли путем аппроксимации данных с помощью следующего уравнения (Andrew MacKay, J., et al. Nat. Mater. 2009, 8, 993-999):

$$V_{\%} = 100\% / \left[1 + \left(\frac{C_{\text{обработка}}}{IC_{50}} \right)^p \right]$$

где V представляет собой жизнеспособность клеток, $C_{\text{обработка}}$ представляет собой концентрацию лекарственного средства, а p представляет собой угол наклона кривой зависимости доза-эффект. Это значение IC50 используют для оценки действенности конъюгатов.

Пример 2. Экспрессия и очистка ZiPP

Свойство термочувствительности ZiPP обеспечивало простую нехроматографическую очистку с помощью ИТС. Появление одной полосы в окрашенном медным красителем геле для SDS-PAGE подтверждало чистоту продукта (фиг. 2А). Два различных ZiPP, (VPKEG)80 (MW=44 кДа) и (VPREG)80 (MW=42 кДа), показаны в качестве иллюстративных примеров очищенных продуктов на фиг. 7А. Маркер длин белков на 50 кДа отмечен в качестве эталона MW в геле, однако маркер длины белков, применяемый в SDS-гелях, получен из глобулярных белков, и, следовательно, его нельзя непосредственно сравнивать с неструктурированными ZiPP. Для подтверждения чистоты и MW авторы настоящего изобретения анализировали очищенный продукт с помощью MALDI-TOF. MALDI-спектр продемонстрировал наличие ионов при значениях соотношения масса/заряд 21 и 42 кДа (пики 1 и 2) для (VPKEG) 80 и значениях соотношения масса/заряд 22 и 44 кДа (пики 3 и 4) для (VPREG)80 (фиг. 7В). MALDI-спектр продемонстрировал наличие ионов при значениях соотношения масса/заряд 20, 30 и 60,5 кДа для (VPKDG)120 и значениях соотношения масса/заряд 21, 32 и 63,8 кДа для (VPRDG) 120 (фиг. 2В), что подтверждало молекулярную массу очищенных конструкций ZiPP (соответственно MW=60,5 кДа, MW=63,8 кДа). Авторы настоящего изобретения также подтвердили внутренне неупорядоченную природу ZiPP путем использования спектров CD. Спектры CD на фиг. 2D и фиг. 7C продемонстрировали отрицательную эллиптичность при малой длине волны и незначительную положительную эллиптичность при большей длине волны, что является характерным для статистического клубка, который является типичным для неупорядоченной структуры, такой как у ELP, и подтверждает неструктурированную природу полимера.

(С) Измерение гидродинамического радиуса проводили с помощью динамического светорассеяния, и его результаты демонстрировали хорошо гидратированные ZiPP по сравнению с контрольными ELP (фиг. 2С). Нативный PAGE в геле демонстрировал, что ZiPP не взаимодействуют с альбумином (фиг. 2Е).

Пример 3. Фармакокинетическое исследование *in vivo*

Для определения фармакокинетических параметров ZiPP концентрацию в плазме крови отслеживали в течение периода 72 ч после системного введения мышам посредством инъекции в хвостовую вену или подкожной инъекции. Незаряженный полимер с сопоставимой длиной в аминокислотах применяли в качестве контроля. Схема эксперимента показана на фиг. 3А и 4А. Полимеры метили флуоресцентным красителем Alexa 488 и вводили мышам. Образцы крови собирали в различные моменты времени в течение периода до 72 ч. ELP120 (VPGAG)120 применяли в качестве контроля длины, а ELP160 (VPGAG)160 применяли в качестве контроля молекулярной массы. На фиг. 3В и 4В показана концентрация полимера в плазме крови в зависимости от времени, прошедшего после инъекции, демонстрирующая, что включение в его состав цвиттерионного мотива (в частности, содержащего К, D и Е в качестве X_1 и X_2 соответственно) придавало свойство "невидимости", которое, в свою очередь, обеспечивало увеличение периода циркуляции полимера по сравнению с незаряженными ELP. Концентрации в плазме крови в зависимости от времени, прошедшего после инъекции, демонстрировали, что ZiPP показывали более хорошие результаты, чем ELP. Эти полимеры соответствовали двухкомпонентной модели, и поэтому период полувыведения и площадь под кривой рассчитывали с помощью этой модели. Двухкомпонентную модель аппроксимировали по концентрации полимера в плазме крови, и в ней получали фармакокинетические параметры: площадь под кривой (AUC) (фиг. 3С и 4С) и период полувыведения (фиг. 3D). AUC рассчитывали

в качестве меры общей длительности воздействия полимеров в течение периода проведения эксперимента. AUC демонстрировала, что VPKEG и VPKDG показывали значительно лучшие результаты, чем незаряженные ELP в качестве контролей длины, а также контроль молекулярной массы. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE, $n=5$ на фиг. 3С, и данные представлены в виде среднего значения \pm SE, $n=3-4$ на фиг. 4С. Окончательный период полувыведения ZiPP увеличивался на 6 часов по сравнению с таковым для конструкций VPGAG (фиг. 3D).

Более того, наиболее описательный фармакокинетический параметр, общая совокупная длительность воздействия полимера в крови, измеренная по площади под кривой концентрации в плазме крови (AUC), для ZiPP был приблизительно в три раза более высоким, чем для незаряженного полипептида VPGAG с такой же длиной цепи (фиг. 3С). Результат показал, что включение в состав пептидного полимера цвиттерионного мотива и, более конкретно, заряженных остатков играет значительную роль в улучшении фармакокинетических характеристик полимера.

Пример 4. Получение характеристик конъюгатов паклитаксел-ZiPP

Паклитаксел (PTX) конъюгировали химическим путем с (VPGXG)₁₆, причем X-V или C в соотношении 1:1, в трейлерном участке на C-конце 120 повторяющихся пентапептидных звеньев VPKEG. Паклитаксел конъюгировали химическим путем с 8 C-концевыми остатками с помощью pH-чувствительного линкера. Схема показана на фиг. 5А. Конъюгат полимер-лекарственное средство очищали с помощью центрифужных фильтрующих устройств Amicon Ultra-15 (MWCO: 10 кДа; Millipore; Биллерика, Массачусетс) и очищенный продукт прогоняли на установке для HPLC для подтверждения отсутствия непрореагировавших свободных лекарственных средств. HPLC-хроматограмма подтверждала чистоту конъюгата полимер-лекарственное средство, при этом количество свободных лекарственных средств было пренебрежимо малым. Очищенный конъюгат ZiPP-PTX имел 3,2-4 молекулы лекарственных средств на полимерную цепь, что подтверждалось рассчитанной с помощью MALDI-TOF-спектров разницей в MW между исходной полимерной цепью ZiPP и конъюгатом ZiPP-PTX (фиг. 5B). Более того, измерение с помощью динамического светорассеяния указывало на то, что после конъюгирования с PTX ZiPP в действительности спонтанно самособирались в наночастицы с гидродинамическим радиусом (Rh) 58 нм. Они самособирались в мицеллы радиусом 58 нм с числом агрегации 26 на мицеллу. Фактор формы (p), рассчитываемый как Rg/Rh, составлял 0,82, что означает образование сферических мицелл.

Пример 5. Противоопухолевая эффективность конъюгатов ZiPP-PTX in vitro

Цитотоксичность ZiPP-PTX in vitro измеряли путем изучения жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций в зависимости от времени. В качестве модели применяли MDA-MB-231, линию раковых клеток молочной железы человека с тройным негативным фенотипом. После 72 ч обработки лекарственным средством пролиферация клеток MDA-MB-231 ингибировалась по сравнению с контролем (без лекарственного средства) (фиг. 5С). Более того, ингибирование было сравнимым с таковым у свободного лекарственного средства. Значение IC50 для свободного лекарственного средства составляло около 2 нМ, а для ZiPP-PTX составляло 12,4 нМ (концентрация применительно к лекарственному средству). Значение IC50 для ZiPP-PTX было в 6 раз более высоким, чем для свободного лекарственного средства, но такой результат является ожидаемым в среде in vitro, где свободные лекарственные средства могут легко диффундировать в клетки и из клеток с помощью переносчиков лекарственных средств, тогда как PTX высвобождается из конъюгата лекарственное средство-полимер только в тех случаях, когда он находится внутри эндосомы. Этот процесс является медленным, поскольку наночастицы поглощаются посредством эндоцитоза, и лекарственное средство высвобождается после того, как наночастицы переместятся в поздние эндосомы, где значение pH является низким. Это низкое значение pH инициирует высвобождение PTX из ZiPP. Эти результаты являются обнадеживающими, поскольку они указывают на то, что конъюгат PTX-полимер является стабильным и в достаточной степени действенным для использования его в платформе in vivo. Значения IC50 представляли концентрацию лекарственного средства, которая снижала жизнеспособность клеток на 50%.

Пример 6. Конъюгаты ZiPP-Tn3

Поливалентный каркасный белок (Tn3) является суперагонистом рецепторов 2 типа для индуцирующего апоптоз лиганда, родственного TNF (TRAIL2), и был выбран в качестве белка для присоединения к ZiPP. Общий вид конструкции слитого белка показан на фиг. 6А. Был выбран суперагонист TRAIL2, поскольку активация TRAILR2 может индуцировать апоптоз при ряде форм рака человека и, следовательно, обладает потенциалом в качестве противораковых терапевтических средств. (Tn3)₆ представляет собой 6 тандемных повторов мономерного звена Tn3, которое было сконструировано Medimune для связывания с TRAIL2 с высокой аффинностью. (Tn3)₆ с ZiPP различной длины экспрессировали рекомбинантным путем в E. coli. Анализ подвергнутых аффинной очистке образцов посредством SDS-PAGE показан на фиг. 6B. Анализ цитотоксичности в отношении Colo205 (раковых клеток толстой кишки) показал, что слитые белки обладали высокой цитотоксичностью и по своей действенности были сравнимыми со свободным белком ((Tn3)₆ без присоединенного ZiPP), как показано на фиг. 6С. Значения IC50 представляли концентрацию лекарственного средства, которая снижала жизнеспособность клеток на 50%.

Вышеприведенное описание конкретных аспектов будет настолько полно раскрывать общий харак-

тер настоящего изобретения, чтобы другие путем применения знаний в рамках квалификации в данной области техники могли без труда модифицировать и/или адаптировать такие конкретные аспекты к различным путям применения без проведения излишних экспериментов и без отступления от общей концепции настоящего изобретения. Таким образом, подразумевается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов, в основе которых лежат идеи и методологические принципы, представленные в данном документе. Следует понимать, что формулировки или терминология, представленные в данном документе, служат для целей описания, а не ограничения, так что специалист в данной области техники должен интерпретировать терминологию или формулировки настоящего описания в свете его идей и методологических принципов.

Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных приводимых в качестве примера аспектов, а должны определяться исключительно в соответствии с нижеследующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

Все публикации, патенты, заявки на патенты и/или другие документы, цитируемые в настоящей заявке, включены посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях в той же степени, как если бы каждые отдельные публикации, патент, заявка на патент и/или другой документ были отдельно указаны как включенные посредством ссылки во всех отношениях.

В целях обеспечения полноты различные аспекты настоящего изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах.

Пункт 1. Конъюгат, содержащий (а) полипептид, содержащий один или несколько заряженных мотивов, при этом каждый заряженный мотив независимо имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1 (VPX₁X₂G), где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту и где X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд; и (b) одну или несколько молекул лекарственного средства, присоединенных к полипептиду.

Пункт 2. Конъюгат согласно пункту 1, где полипептид содержит множество заряженных мотивов.

Пункт 3. Конъюгат согласно пункту 2, где множество заряженных мотивов повторяется тандемно.

Пункт 4. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где полипептид дополнительно содержит один или несколько незаряженных мотивов, при этом каждый незаряженный мотив независимо имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 3 (VPGXG), где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина.

Пункт 5. Конъюгат согласно пункту 4, где полипептид содержит множество незаряженных мотивов.

Пункт 6. Конъюгат согласно пункту 5, где множество незаряженных мотивов повторяется тандемно.

Пункт 7. Конъюгат согласно любому из пунктов 4-6, где один или несколько незаряженных мотивов расположены между по меньшей мере двумя смежными заряженными мотивами полипептида.

Пункт 8. Конъюгат согласно пункту 1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 (VPX₁X₂G)_n, где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше.

Пункт 9. Конъюгат согласно пункту 4, где полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 (VPGXG)_n, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше.

Пункт 10. Конъюгат согласно пункту 4, где полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 (VPX₁X₂G)_n(VPGXG)_m, где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше.

Пункт 11. Конъюгат согласно пункту 4, где полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 (VPGXG)_m(VPX₁X₂G)_n, где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше.

Пункт 12. Конъюгат согласно пункту 4, где полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 {(VPX₁X₂G) (VPGXG)}_b, где X₁ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X₂ представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а b представляет собой целое число, равное 1 или больше.

Пункт 13. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-12, где X₁ представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, и где X₂ представляет собой положительно заряженную аминокислоту.

Пункт 14. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-12, где X₁ представляет собой положительно заряженную аминокислоту и где X₂ представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту.

Пункт 15. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где отрицательно заряженная ами-

нокислота независимо выбрана из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты.

Пункт 16. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где положительно заряженная аминокислота независимо выбрана из лизина и аргинина.

Пункт 17. Конъюгат согласно любому из пунктов 4-16, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина.

Пункт 18. Конъюгат согласно пункту 17, где X выбран из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, аспарагина, глутамин, цистеина, селеноцистеина, глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

Пункт 19. Конъюгат согласно пункту 18, где X выбран из глицина и валина.

Пункт 20. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где полипептид дополнительно содержит линкер.

Пункт 21. Конъюгат согласно пункту 20, где линкер содержит один или несколько цистеиновых остатков.

Пункт 22. Конъюгат согласно любому из пунктов 20-21, где линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: (GGC), SEQ ID NO: ((GGC)₈), SEQ ID NO: ((G₄S)₃) и SEQ ID NO: ((VPGXG)₁₆, где X представляет собой валин или цистеин, присутствующие в соотношении 1:1).

Пункт 23. Конъюгат согласно любому из пунктов 20-22, где линкер расположен на С-конце, на N-конце или как на С-, так и на N-конце полипептида.

Пункт 24. Конъюгат согласно любому из пунктов 20-23, где одна или несколько молекул лекарственного средства присоединены к полипептиду с помощью линкера.

Пункт 25. Конъюгат согласно любому из пунктов 20-24, где молекула лекарственного средства присоединена к полипептиду посредством тиолреактивной группы в линкере.

Пункт 26. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где одна или несколько молекул лекарственного средства выбраны из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, пептида, белка, углевода и их комбинации.

Пункт 27. Конъюгат согласно пункту 26, где молекула лекарственного средства включает малую молекулу.

Пункт 28. Конъюгат согласно пункту 26, где молекула лекарственного средства включает белок.

Пункт 29. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-25, где молекула лекарственного средства включает противораковое терапевтическое средство.

Пункт 30. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-25, где молекула лекарственного средства включает антитело.

Пункт 31. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-25, где молекула лекарственного средства включает паклитаксел.

Пункт 32. Конъюгат согласно любому из пунктов 1-25, где молекула лекарственного средства включает Tn3 (суперагонист TRAIL).

Пункт 33. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где конъюгат получен для введения субъекту.

Пункт 34. Конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов, где полипептид конъюгата экспрессируется рекомбинантным путем.

Пункт 35. Конъюгат согласно пункту 28, где конъюгат экспрессируется рекомбинантным путем.

Пункт 36. Композиция, содержащая конъюгат согласно любому из предыдущих пунктов.

Пункт 37. Полинуклеотид, кодирующий полипептид согласно любому из пунктов 1-35.

Пункт 38. Полинуклеотид, кодирующий конъюгат согласно пункту 28.

Пункт 39. Вектор, содержащий полинуклеотид согласно пункту 37 или пункту 38.

Пункт 40. Способ доставки субъекту молекулы лекарственного средства, при этом способ включает введение субъекту конъюгата согласно любому из пунктов 1-35.

Пункт 41. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, при этом способ включает введение субъекту конъюгата согласно любому из пунктов 1-35.

Пункт 42. Способ определения наличия мишени в образце, при этом способ включает приведение образца в контакт с конъюгатом согласно любому из пунктов 1-35 в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце; и выявление наличия комплекса, где наличие комплекса указывает на наличие мишени в образце.

Пункт 43. Способ согласно пункту 42, где образец получают от субъекта, и способ дополнительно включает диагностику заболевания, прогнозирование или оценку эффективности лечения субъекта.

Пункт 44. Способ согласно пункту 43, где в случае, если способ дополнительно включает оценку эффективности лечения субъекта, способ дополнительно включает модификацию лечения субъекта в случае необходимости в улучшении эффективности.

Пункт 45. Способ диагностики заболевания у субъекта, при этом способ включает приведение образца от субъекта в контакт с конъюгатом согласно любому из пунктов 1-35 в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце; определение уровня мишени в образце, где уровень комплекса указывает на уровень мишени в

образце; и сравнение уровня мишени в образце с контрольным уровнем мишени, где уровень мишени, отличный от контрольного уровня, указывает на заболевание у субъекта.

Пункт 46. Способ согласно пункту 45, где контрольный уровень соответствует уровню у субъекта в момент времени до или в течение периода, в который субъект начал лечение, и где образец берут у субъекта в более поздний момент времени.

Пункт 47. Способ согласно пункту 45, где образец берут у субъекта в момент времени в течение периода, в который субъекта подвергают лечению, и где контрольный уровень соответствует уровню в отсутствие заболевания или уровню в момент времени до периода, в который субъект начал лечение.

Пункт 48. Способ согласно любому из пунктов 45-47, при этом способ дополнительно включает модификацию лечения или назначение другого вида лечения субъекту в случае, если данный вид лечения определяют как неэффективный при лечении заболевания.

Пункт 49. Способ согласно любому из пунктов 40-48, где конъюгат метят репортерной молекулой.

Пункт 50. Способ согласно любому из пунктов 40-49, где конъюгат вводят субъекту внутривенным, внутриартериальным, внутривнутрибрюшинным или внутривнутрипухоловым путем.

Пункт 51. Способ согласно любому из пунктов 40-50, где конъюгат характеризуется пониженной антигенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG).

Пункт 52. Способ согласно любому из пунктов 40-50, где конъюгат характеризуется пониженной иммуногенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG).

Пункт 53. Способ согласно любому из пунктов 40-52, где заболевание выбрано из рака, метаболического заболевания, аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и ортопедического нарушения.

Пункт 54. Способ согласно пункту 53, где заболевание включает рак.

Пункт 55. Способ согласно пункту 54, где рак выбран из рака молочной железы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака легкого, рака предстательной железы, рака яичка, рака головного мозга, рака кожи, рака прямой кишки, рака желудка, рака пищевода, форм саркомы, рака трахеи, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака лимфатической системы, рака шейки матки, рака вульвы, меланомы, мезотелиомы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, рака костей, карциномы, саркомы и рака мягких тканей.

Пункт 56. Способ согласно пункту 55, где рак включает рак молочной железы.

Последовательности

SEQ ID NO: 1

VPX_1X_2G , где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту и где X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд.

SEQ ID NO: 2

$(VPX_1X_2G)_n$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше.

SEQ ID NO: 3

$VPGXG$, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина.

SEQ ID NO: 4

$(VPGXG)_n$, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n представляет собой целое число, равное 1 или больше.

SEQ ID NO: 5

$(VPX_1X_2G)_n(VPGXG)_m$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше.

SEQ ID NO: 6

$(VPGXG)_m(VPX_1X_2G)_n$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а n и m независимо представляют собой целое число, равное 1 или больше.

SEQ ID NO: 7

$\{(VPX_1X_2G)(VPGXG)\}_b$, где X_1 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, X_2 представляет собой отрицательно или положительно заряженную аминокислоту, имеющую противоположный заряд, X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, а b представляет собой целое число, равное 1 или больше.

SEQ ID NO: 8 GGC

SEQ ID NO: 9 (GGC)₈

19. Конъюгат по любому из пп.16-18, где линкер расположен на С-конце, на N-конце или как на С-, так и на N-конце полипептида.
20. Конъюгат по любому из пп.16-19, где одна или несколько молекул лекарственного средства присоединены к полипептиду с помощью линкера.
21. Конъюгат по любому из пп.16-20, где молекула лекарственного средства присоединена к полипептиду посредством тиол-реактивной группы в линкере.
22. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где одна или несколько молекул лекарственного средства выбраны из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, пептида, белка, углевода и их комбинации.
23. Конъюгат по п.22, где молекула лекарственного средства включает малую молекулу.
24. Конъюгат по п.22, где молекула лекарственного средства включает белок.
25. Конъюгат по любому из пп.1-21, где молекула лекарственного средства включает противораковое терапевтическое средство.
26. Конъюгат по любому из пп.1-21, где молекула лекарственного средства включает антитело.
27. Конъюгат по любому из пп.1-21, где молекула лекарственного средства включает паклитаксел.
28. Конъюгат по любому из пп.1-21, где молекула лекарственного средства включает Tn3 (суперагонист TRAIL).
29. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где конъюгат получен для введения субъекту.
30. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где полипептид конъюгата экспрессируется рекомбинантным путем.
31. Конъюгат по п.24, где конъюгат экспрессируется рекомбинантным путем.
32. Композиция для улучшения фармакокинетических и фармакодинамических характеристик одной или более молекул лекарственного средства, где композиция содержит конъюгат по любому из предыдущих пунктов.
33. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.1-31.
34. Полинуклеотид, кодирующий конъюгат по п.24.
35. Вектор для получения полипептида конъюгата с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками одной или более молекул лекарственного средства, где вектор содержит полинуклеотид по п.33 или 34.
36. Способ доставки субъекту молекулы лекарственного средства, при этом способ включает введение субъекту конъюгата по любому из пп.1-31.
37. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, при этом способ включает введение субъекту конъюгата по любому из пп.1-31.
38. Способ определения наличия мишени в образце, при этом способ включает приведение образца в контакт с конъюгатом по любому из пп.1-31 в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце; и выявление наличия комплекса, где наличие комплекса указывает на наличие мишени в образце.
39. Способ диагностики заболевания у субъекта, при этом способ включает приведение образца от субъекта в контакт с конъюгатом по любому из пп.1-31 в условиях, обеспечивающих возможность образования комплекса между молекулой лекарственного средства и мишенью в образце;
определение уровня мишени в образце, где уровень комплекса указывает на уровень мишени в образце; и
сравнение уровня мишени в образце с контрольным уровнем мишени, где уровень мишени, отличный от контрольного уровня, указывает на заболевание у субъекта.
40. Способ по п.39, где контрольный уровень соответствует уровню у субъекта в момент времени до или в течение периода, в который субъект начал лечение, и где образец берут у субъекта в более поздний момент времени.
41. Способ по п.39, где образец берут у субъекта в момент времени в течение периода, в который субъекта подвергают лечению, и где контрольный уровень соответствует уровню в отсутствие заболевания или уровню в момент времени до периода, в который субъект начал лечение.
42. Способ по любому из пп.39-41, при этом способ дополнительно включает модификацию лечения или назначение другого вида лечения субъекту в случае, если данный вид лечения определяют как неэффективный при лечении заболевания.
43. Способ по любому из пп.36-42, где конъюгат метят репортерной молекулой.
44. Способ по любому из пп.36-43, где конъюгат вводят субъекту внутривенным, внутриаартериальным, внутрибрюшинным или внутриопухолевым путем.
45. Способ по любому из пп.36-44, где конъюгат характеризуется пониженной антигенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG).
46. Способ по любому из пп. 36-44, где конъюгат характеризуется пониженной иммуногенностью по сравнению с молекулой лекарственного средства, конъюгированной с полиэтиленгликолем (PEG).
47. Способ по любому из пп.36-46, где заболевание выбрано из рака, метаболического заболевания,

аутоиммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и ортопедического нарушения.

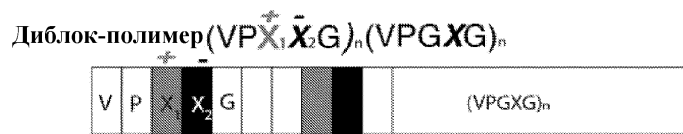
48. Способ по п.47, где заболевание включает рак.

49. Способ по п.48, где рак выбран из рака молочной железы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака легкого, рака предстательной железы, рака яичка, рака головного мозга, рака кожи, рака прямой кишки, рака желудка, рака пищевода, форм саркомы, рака трахеи, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака лимфатической системы, рака шейки матки, рака вульвы, меланомы, мезотелиомы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака щитовидной железы, рака костей, карциномы, саркомы и рака мягких тканей.

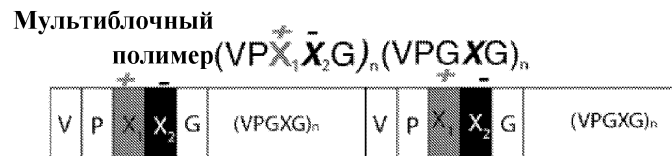
50. Способ по п.49, где рак включает рак молочной железы.



Фиг. 1А



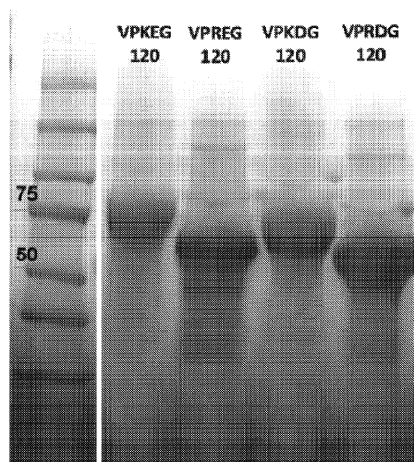
Фиг. 1В



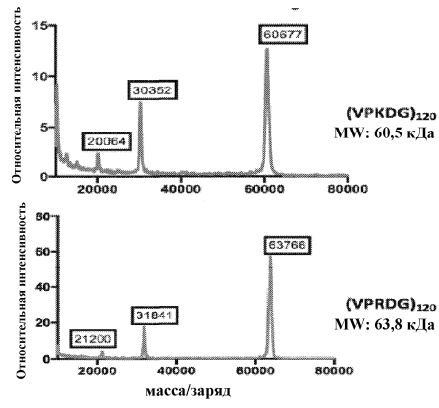
Фиг. 1С

<i>Возможные последовательности</i> $(VPX_1X_2G)_n$	
VPKEG	VPKDG
VPREG	VPRDG

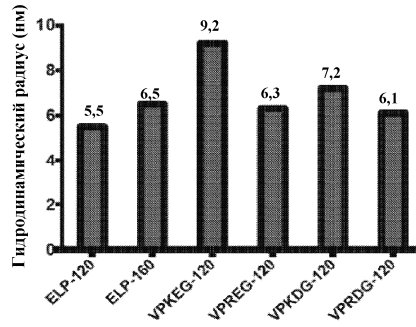
Фиг. 1D



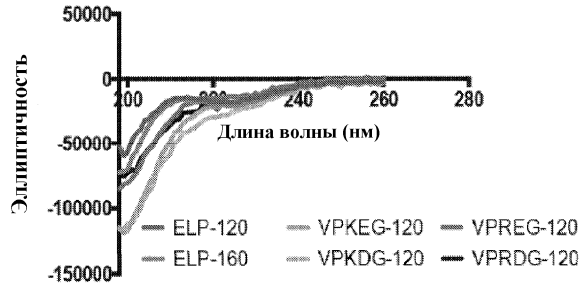
Фиг. 2А



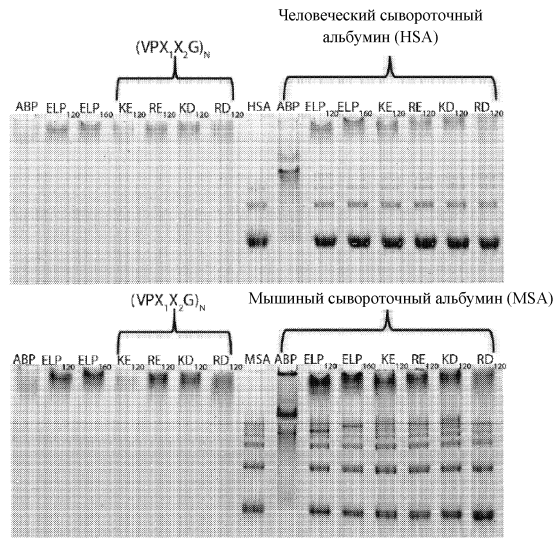
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D



ABP – альбумин-связывающий пептид

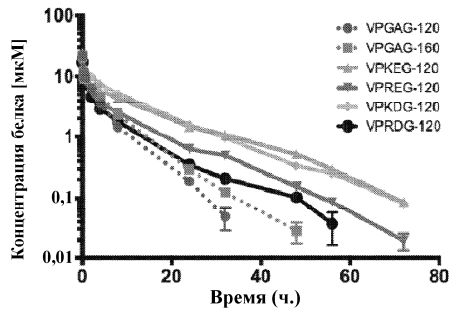
Фиг. 2Е



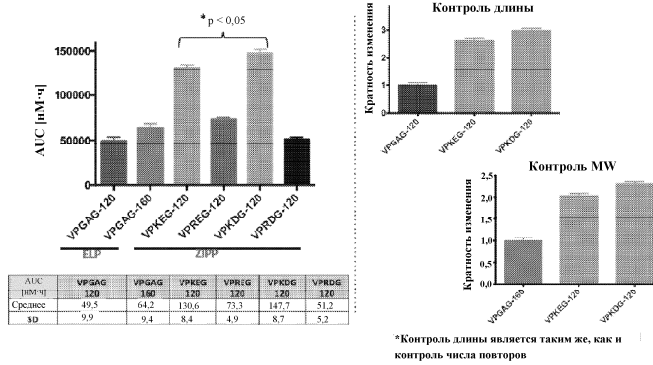
РК-исследование с i.v. введением

- Схема эксперимента
- VPGAG-120 (контроль числа повторов)] ELP
 - VPGAG-160 (контроль MW)] ELP
 - VPKEG-120] ZIPP
 - VPREG-120] ZIPP
 - VPKDG-120] ZIPP
 - VPRDG-120] ZIPP

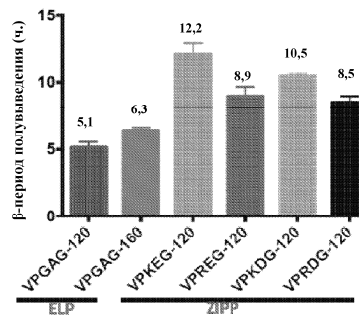
Фиг. 3А



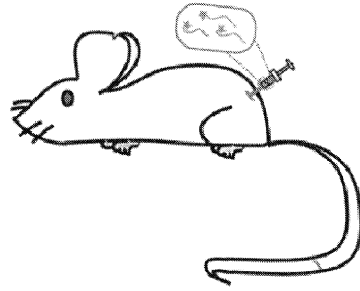
Фиг. 3В



Фиг. 3С



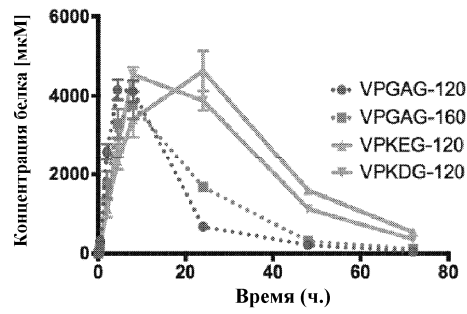
Фиг. 3Д



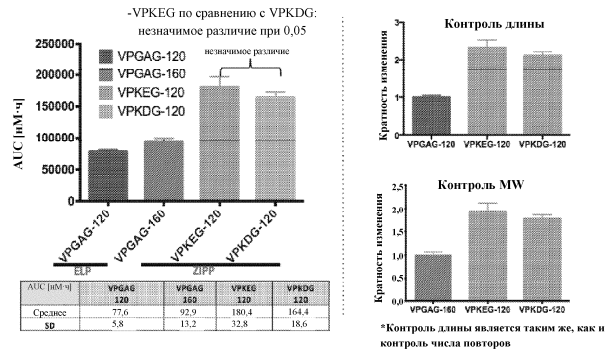
➤ **Схема эксперимента**

- VPGAG-120 (контроль числа повторов)
- VPGAG-160 (контроль MW)
- VPKEG-120
- VPKDG-120

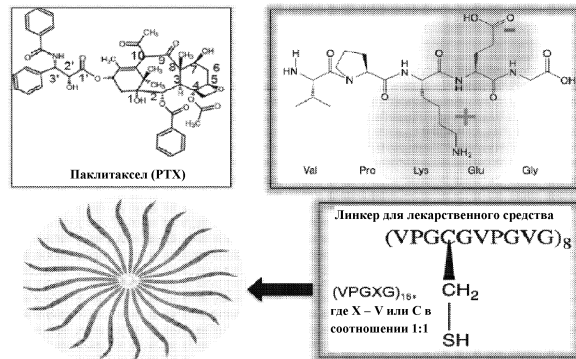
Фиг. 4А



Фиг. 4В

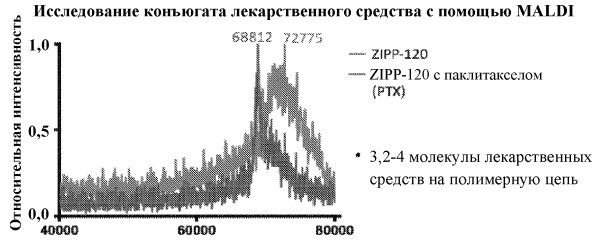


Фиг. 4С

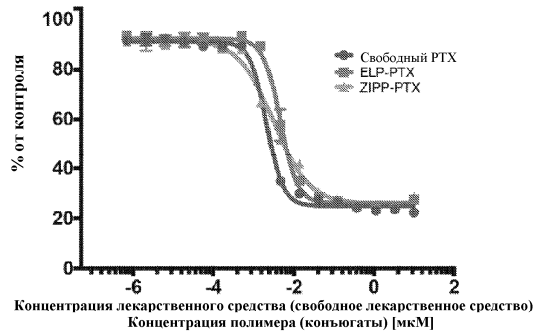


Фиг. 5А

	-PTX		+PTX			CMC (мкМ)
	Rh (нМ)	Rh (нМ)	Rg (нМ)	ρ	Nagg	
ZIPP ₁₂₀	7	58	47,6	0,82	26	4

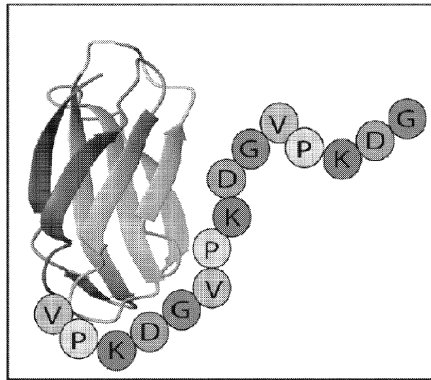


Фиг. 5В

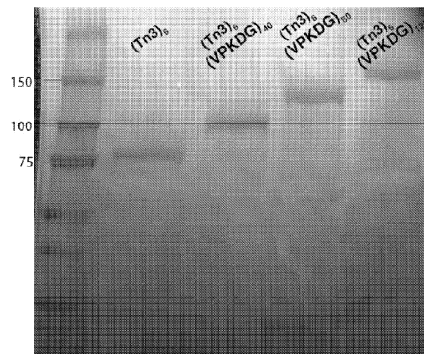


	Свободный PTX		СР-PTX		ZIPP-PTX	
	[Лекарственное средство]	[Полимер]	[Лекарственное средство]	[Полимер]	[Лекарственное средство]	[Полимер]
IC50 [нМ]	2	4,6	9,2	3,1	12,4	

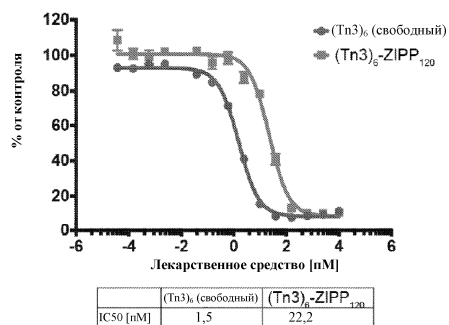
Фиг. 5С



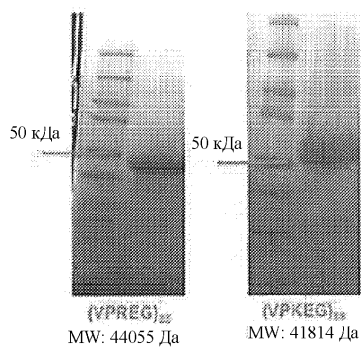
Фиг. 6А



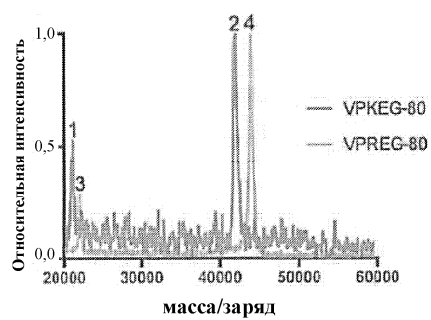
Фиг. 6В



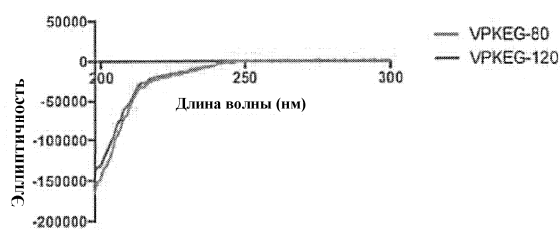
Фиг. 6С



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 7С

