

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092487** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2021.02.05**

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 38/46* (2006.01)  
*C12N 9/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.04.16**

---

(54) **ФЕРМЕНТЫ КИНУРЕНИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **62/658,261**

(32) **2018.04.16**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/027623**

(87) **WO 2019/204269 2019.10.24**

(71) Заявитель:  
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:

**Джорджиу Джордж, Стоун Эверетт,  
Блэйзек Джон, Карамитрос Кростос  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Описаны способы и композиции, относящиеся к применению белка с активностью кинуруениназы. Например, в определенных аспектах может быть раскрыта модифицированная кинуруениназа, способная разлагать кинуруенин. Кроме того, в определенных аспектах данного изобретения предложены композиции и способы для лечения онкологического заболевания за счет снижения уровней кинуруенина с использованием раскрытых белков или нуклеиновых кислот.

**202092487  
A1**

**202092487**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565150EA/061

### ФЕРМЕНТЫ КИНУРЕНИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/658261, поданной 16 апреля 2018 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0002] Данное изобретение было осуществлено при государственной поддержке по гранту № R01 CA154754, присужденному Национальным институтом здоровья. Правительство США имеет определенные права на данное изобретение.

Уровень техники

#### 1. Область техники

[0003] Данное изобретение в целом относится к области молекулярной биологии и онкологии. В частности, оно относится к сконструированным ферментам кинурениназы и способам их применения.

#### 2. Описание предшествующего уровня техники

[0004] Кинуренин является метаболитом аминокислоты триптофана, создаваемым за счет действия индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) или триптофан-2,3-диоксигеназы (ТДО). Кинуренин оказывает множество эффектов на физиологию клетки, из которых одним из наиболее значительных является модуляция Т-клеточных ответов. Многие опухолевые клетки регулируют синтез ферментов ИДО и/или ТДО для повышения локальной концентрации кинуренина, что сопровождается снижением уровней триптофана. В свою очередь высокие уровни кинуренина служат мощным средством ингибирования функций инфильтрирующих опухоль Т-клеток, которые в ином случае атаковали бы опухоль.

[0005] Значимость выработки кинуренина при онкологических заболеваниях хорошо известна, а ее результатом стала разработка ингибиторов кинуренин-генерирующих ферментов ИДО и ТДО; по меньшей мере одно из этих соединений на данный момент проходит клиническую оценку фазы II. Однако ингибирование ИДО или ТДО является проблематичным для противораковой терапии, поскольку: (1) существует две изоформы ИДО, и вместе с ТДО ингибирование всех возможных путей генерации кинуренина требует в настоящее время создания нескольких низкомолекулярных ингибиторов; (2) может возникать резистентность к ингибированию.

[0006] Человеческая кинурениназа имеет строгое предпочтение в отношении разложения 3'ОН-кинуренина, который разлагается с каталитической эффективностью ( $K_{\text{кат}}/K_M$ ), приблизительно в 1000 раз большей, чем наблюдаемая в случае разложения кинуренина. В противоположность этому, некоторые бактериальные ферменты, такие как ферменты из *P. fluorescens*, имеют строгое предпочтение в отношении кинуренина по сравнению с 3'ОН-кинуренином. Для терапевтических целей важно наличие агента (т. е. терапевтического фермента),

который имеет необходимые фармакологические свойства для *in vivo* применений на людях. Они включают: (i) высокую каталитическую активность в отношении кинуренина, (ii) повышенную стабильность к дезактивации в сыворотке в целях обеспечения длительного снижения уровней кинуренина в сыворотке и тканях после инъекции одной дозы.

#### Краткое описание сущности изобретения

[0007] Аспекты данного изобретения позволяют преодолеть основной недостаток существующего уровня техники путем создания ферментов, которые содержат сконструированные полипептидные последовательности, способные разлагать L-кинуренин, имеющие высокую степень идентичности последовательности с человеческим ферментом во избежание стимуляции нежелательных иммунных ответов и демонстрирующие благоприятную фармакокинетику в сыворотке, необходимую для противораковой терапии. В РСТ/US2014/053437 авторы описали ферменты мутантной человеческой кинурениназы (также называемой в данном документе *h*-KYNase или HsKYN), имеющие в до 24 раз большую каталитическую активность в отношении разложения KYN по сравнению с человеческим ферментом дикого типа. Существует необходимость в создании ферментов мутантной *h*-KYNase, имеющих большую каталитическую активность и стабильность по сравнению с описанными в РСТ/US2014/053437. Аспекты данной заявки удовлетворяют эту необходимость и раскрывают мутантные ферменты, имеющие большую каталитическую активность, а также мутантные ферменты, имеющие большую каталитическую активность, чем *h*-KYNase дикого типа, а также ферменты с повышенной стабильностью в сыворотке.

[0008] В первом варианте осуществления предложен выделенный модифицированный фермент кинурениназы человека, причем указанный модифицированный фермент имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную с ферментом кинурениназы человека по SEQ ID NO: 1, 2, 3 или одним из полипептидов, приведенных в Таблице 1, и содержащую по меньшей мере одну замену (относительно последовательности SEQ ID NO: 1), выбранную из группы, состоящей из L8P, K38E, Y47L, I48F, K50Q, I51M, S60N, K64N, D65G, E66K, N67D, N67P, D67S, A68F, A68T, A68V, F71L, F71M, L72N, K84E, E88N, E89K, E89S, E90Q, D92E, K93N, K93T, A95H, A95Q, K96N, I97H, I97L, I97V, A98G, A99G, A99I, A99R, A99S, A99T, A99V, Y100N, Y100S, Y100T, G101A, H102W, E103F, E103H, E103N, E103Q, E103R, E103V, E103W, V104D, V104E, V104F, V104H, V104K, V104L, V104R, G105A, G105H, G105S, G105T, E106D, K106D, K106E, K106H, K106N, R107P, R107S, P108R, I110A, I110F, I110L, I110M, I110T, T111D, T111H, T111N, T111R, G112A, G112C, G112D, G112K, G112L, G112M, G112Q, G112R, G112S, G112T, G112Y, N127K,

I131V, A132V, L133V, A136T, L137T, T138S, N140D, H142Q, Q14R, Y156H, K163T, D168E, H169R, Q175L, I183F, I183L, I183P, I183S, E184A, E184D, E184R, E184T, E184V, E185T, M187L, M189I, K191A, K191G, K191H, K191M, K191N, K191R, K191S, K191T, K191W, E197A, E197D, E197F, E197K, E197M, E197Q, E197S, E197T, E197V, I201C, I201E, I201F, I201H, I201L, I201S, I201T, I201V, H203K, L219M, L219W, F220L, V223I, F225Y, H230F, H230L, H230Y, N232S, Y246F, F249W, D250E, S274A, S274C, S274G, S274N, S274T, L278M, A280G, A280S, A280T, G281S, A282M, A282P, G284N, I285L, V303L, V303S, F306W, F306Y, S311N, K315E, D317E, D317K, I331C, I331L, I331N, I331S, I331T, I331V, N333T, P334N, P335T, L337T, L338A, L338Q, S341I, K373E, K373N, N375A, N375H, Y376C, Y376F, Y376L, K378G, K378P, K378Q, K378R, K380G, K380S, A382G, A382R, A382T, T383S, K384G, K384N, P386K, P386S, V387L, N389E, I405L, F407Y, S408D, S408N, N411R, D413S, D413V, Q416T, E419A, E419L, K420E, R421N, V424I, K427M, N429E, G432A и A436T. В некоторых аспектах аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 3; или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной одному из ферментов из Таблицы 1. В определенных аспектах фермент может содержать замену в A282 (например, A282M или A282P), F306 (например, F306W или F306Y) или F249, такую как F249W. В дополнительных аспектах фермент может содержать замену L72N. В других дополнительных аспектах фермент может содержать замену F306W. В конкретных аспектах фермент может содержать замены H102W и N333T. В другом аспекте фермент может содержать замену в A99. В некоторых аспектах фермент может содержать замену в G112. В определенных конкретных аспектах фермент содержит замену в E103. В других аспектах фермент содержит замену в V104. В дополнительных аспектах фермент может содержать замену в S408. В нескольких аспектах фермент может содержать замену I183P. В некоторых конкретных аспектах фермент может содержать замену R107P. В другом конкретном аспекте фермент может содержать замену A436T.

[0009] В других дополнительных аспектах фермент может содержать по меньшей мере одну замену, выбранную из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T. В определенных аспектах фермент содержит по меньшей мере две, три, четыре или пять замен, выбранных из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T. В некоторых аспектах фермент может содержать замены L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T. В дополнительном аспекте фермент имеет каталитическую активность в отношении KYN ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) по меньшей мере  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . В других аспектах фермент имеет каталитическую активность в отношении KYN ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) от  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $10000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $20000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; или от  $25000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $35000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

[0010] В других дополнительных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности одного из полипептидов из Таблицы 1. В конкретных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, на 100% идентичную одному из полипептидов из Таблицы 1. В других дополнительных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В конкретных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 2. В определенных аспектах аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. В конкретных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 3.

[0011] В дополнительном аспекте ферменты кинурениназы по вариантам осуществления дополнительно содержат аминокислотные замены, описанные в WO/2015/031771, WO/2016/033488 или WO/2017/151860, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0012] В дополнительных аспектах предложены полипептиды, содержащие нативную или модифицированную кинурениназу человека или примата, способную к разложению KYN. В некоторых вариантах осуществления полипептиды способны к разложению KYN в физиологических условиях. Например, полипептиды имеют каталитическую эффективность в отношении KYN ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ), составляющую по меньшей мере около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$   $M^{-1}s^{-1}$  или находящуюся в любом определяемом этими значениями диапазоне.

[0013] Обсуждаемый выше модифицированный полипептид может характеризоваться наличием определенного процента идентичности по сравнению с немодифицированным полипептидом (например, нативным полипептидом, таким как человеческая кинурениназа по SEQ ID NO: 1) или любой раскрытой в данном документе полипептидной последовательностью. Например, немодифицированный полипептид может содержать по меньшей мере или вплоть до около 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 465 остатков (или любой определяемый этими значениями диапазон) нативной кинурениназы. Процент идентичности может составлять около, не более или по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% (или любой определяемый этими значениями диапазон) между модифицированным и немодифицированным полипептидами или между любыми двумя сравниваемыми последовательностями. Также подразумевается, что обсуждаемый выше процент идентичности может относиться к конкретной

модифицированной области полипептида по сравнению с немодифицированной областью полипептида. Например, полипептид может содержать модифицированный или мутантный сайт распознавания субстрата, который можно охарактеризовать на основании идентичности аминокислотной последовательности модифицированного или мутантного сайта распознавания субстрата кинурениназы с последовательностью немодифицированной или мутантной кинурениназы того же вида или отличного вида. Модифицированный или мутантный человеческий полипептид характеризующийся, например, как имеющий по меньшей мере 90% идентичности с немодифицированной кинурениназой, означает, что по меньшей мере 90% аминокислот в этом модифицированном или мутантном человеческом полипептиде идентичны аминокислотам в немодифицированном полипептиде.

[0014] Такой немодифицированный полипептид может представлять собой нативную кинурениназу, в частности, человеческую изоформу или изоформы других приматов. Например, нативная человеческая кинурениназа может иметь последовательность SEQ ID NO: 1. Неограничивающие примеры нативной кинурениназы других приматов включают кинурениназу *Pongo abelii* (Genbank ID: XP\_009235962.1, GI: 686708656), кинурениназу *Macaca fascicularis* (Genbank ID: ENH54849.1, GI: 355750522) и кинурениназу *Pan troglodytes* (Genbank ID: XP\_003309314.1, GI: 332814521). Типовые нативные полипептиды включают последовательность, имеющую около, не более или по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности (или любой определяемый этими значениями диапазон) с SEQ ID NO:1. Например, нативный полипептид может содержать по меньшей мере или вплоть до около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 465 остатков (или любой определяемый этими значениями диапазон) последовательности SEQ ID NO:1.

[0015] В некоторых аспектах полипептиды по вариантам осуществления содержат кинурениназу, связанную с гетерологичной аминокислотной последовательностью. Например, кинурениназа может быть связана с гетерологичной аминокислотной последовательностью в виде слитого белка. В конкретном варианте осуществления кинурениназа связана с аминокислотными последовательностями, такими как Fc IgG, альбумин, альбумин-связывающий белок или полипептид XTEN, для повышения времени полужизни *in vivo*.

[0016] Для повышения времени нахождения в сыворотке кинурениназа может быть связана с одной или более полиэфирными молекулами. В конкретном варианте осуществления полиэфир представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полипептид может быть связан (например, ковалентно) с ПЭГ посредством конкретных аминокислотных остатков, таких как лизин или цистеин. Для терапевтического применения такой содержащий кинурениназу полипептид можно диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе.

[0017] В некоторых аспектах предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая такую кинурениназу. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота была кодон-оптимизирована для экспрессии в бактериях. В конкретных вариантах осуществления бактерии представляют собой *E. coli*. В других аспектах нуклеиновая кислота была кодон-оптимизирована для экспрессии в грибах (например, дрожжах), насекомых или млекопитающих. В дополнительных аспектах предложены векторы, такие как экспрессионные векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая кинурениназу, функционально связана с промотором, включая, но не ограничиваясь этим, гетерологичные промоторы. В одном варианте осуществления кинурениназу доставляют в целевую клетку посредством вектора (например, вектора для генной терапии). Такие вирусы могут быть модифицированы посредством технологии рекомбинантных ДНК для обеспечения возможности экспрессии кодирующей кинурениназу нуклеиновой кислоты в целевой клетке. Эти векторы могут быть получены из векторов невирусного (например, плазмиды) или вирусного (например, аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирус, лентивирус, герпесвирус или вирус осповакцины) происхождения. Невирусные векторы предпочтительно находятся в комплексе с агентами для облегчения попадания ДНК внутрь через клеточную мембрану. Примеры таких комплексов невирусных векторов включают формы с поликатионными агентами, которые облегчают конденсацию ДНК и липидных систем доставки. Пример липидной системы доставки включает доставку нуклеиновых кислот с помощью липосом.

[0018] В других дополнительных аспектах в данном изобретении дополнительно предусмотрены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. Клетки-хозяева могут представлять собой бактерии (например, *E. coli*), клетки грибов (например, дрожжей), клетки насекомых или клетки млекопитающих.

[0019] В некоторых вариантах осуществления векторы вносят в клетки-хозяев для экспрессии кинурениназы. Экспрессия белков может происходить любым подходящим образом. В одном варианте осуществления экспрессия белков в клетке-хозяине происходит таким образом, чтобы белок был гликозилированным. В другом варианте осуществления экспрессия белков в клетке-хозяине происходит таким образом, чтобы белок был агликозилированным.

[0020] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой любой рак, чувствительный к снижению уровней кинуренина. В одном варианте осуществления в данном изобретении предусмотрен способ лечения опухолевой клетки или онкологического пациента, включающий введение состава, содержащего такой полипептид. В некоторых вариантах осуществления введение происходит в таких условиях, чтобы по меньшей мере часть клеток рака была уничтожена. В другом варианте осуществления состав содержит такую кинурениназу, имеющую активность разложения кинуренина в физиологических условиях и дополнительно

содержащую присоединенную цепь полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой фармацевтический состав, содержащий любую из обсуждаемых выше кинурениназ и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Такие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества хорошо известны специалистам в данной области техники. Все вышеописанные кинурениназы можно рассматривать как пригодные для терапии людей.

[0021] В дополнительном варианте осуществления также может быть предложен способ лечения опухолевой клетки, включающий введение состава, содержащего небактериальную (полученную от млекопитающего, например, примата или мыши) кинурениназу, которая обладает активностью разложения кинуренина, или кодирующую ее нуклеиновую кислоту.

[0022] В соответствии с определенными аспектами данного изобретения такой состав, содержащий кинурениназу, можно вводить внутривенно, интрадермально, внутриартериально, внутривнутрибрюшинно, внутривнутриочагово, внутривнутричерепно, внутривнутрисуставно, внутривнутрипростатически, внутривнутриплеврально, интравнутрирасиновидно, эндотравнутритрахеально, интравнутриназально, интравнутривитреально, интравнутривагинально, интравнутриректально, интравнутритуморально, внутривнутримышечно, подкожно, субконъюнктивально, внутривнутрипузырно, мукозально, интравнутриперикардially, внутривнутрипуповинно, интравнутриокулярно, перорально, местно, путем ингаляции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, через катетер, через лаваж, в липидных композициях (например, липосомах) или любым другим способом или с помощью комбинации вышеперечисленного, как известно специалисту в данной области техники.

[0023] В дополнительном варианте осуществления указанный способ также включает применение к субъекту по меньшей мере второй противораковой терапии. Вторая противораковая терапия может представлять собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормональную терапию, иммунотерапию или цитокиновую терапию. В определенных аспектах вторая противораковая терапия может представлять собой терапию на основе ингибиторов иммунных контрольных точек, такую как терапия на основе анти-PD-1, анти-CTLA-4, анти-PD-L1 антитела, анти-LAG3, анти-TIM-3, анти-ICOS, анти-CD137, анти-CD40, анти-KIR, анти-CD40L, анти-GITR или анти-OX40. В дополнительных аспектах вторая противораковая терапия может представлять собой терапию на основе антител, например, конъюгатов антител - лекарственный препарат. В других дополнительных аспектах вторая противораковая терапия представляет собой иммунотерапию, такую как введение иммунных эффекторных клеток или иммуногенной композиции. Например, иммуногенная композиция может содержать антигены раковых клеток и, необязательно, адъювант. В некоторых аспектах



иммунные эффекторские клетки могут включать NK-клетки, Т-клетки (например, CAR Т-клетки) или NK/Т-клетки.

[0024] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена Т-клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR) и фермент кинурениназы по вариантам осуществления для применения при лечении субъекта с раком. В некоторых аспектах клетка может быть трансфицирована ДНК, кодирующей CAR и кинурениназу, и, в некоторых случаях, транспозазу.

[0025] Мишенью CAR может быть любой представляющий интерес антиген раковых клеток, включая, например, HER2, CD19, CD20 и GD2. Антигенсвязывающие области или домены могут содержать фрагмент цепей  $V_H$  и  $V_L$  одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, такой как описаны в патенте США № 7109304, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Фрагмент также может представлять собой любое количество антигенсвязывающих доменов антитела, специфического к антигену человека. В более конкретном варианте осуществления фрагмент представляет собой антиген-специфический scFv, кодируемый последовательностью, оптимизированной в отношении частоты использования кодонов человека, для экспрессии в человеческих клетках. Дополнительные примеры CAR смотрите, например, в WO 2012/031744, WO 2012/079000, WO 2013/059593 и патенте США № 8465743, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[0026] Кинурениназа может представлять собой любую раскрытую в данном документе кинурениназу. Способы трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники, но в определенных аспектах используют высокоэффективные способы трансфекции, такие как электропорация. Например, нуклеиновые кислоты можно вносить в клетки, используя аппарат для нуклеофекции. Предпочтительно этап трансфекции не включает инфицирование или трансдукцию клеток вирусом, что может вызвать генотоксичность и/или привести к иммунным ответам на клетки, содержащие вирусные последовательности, у проходящего лечение субъекта.

[0027] Широкий ряд конструкций CAR и экспрессионных векторов для них известны в данной области техники и дополнительно подробно описаны в данном документе. Например, в некоторых аспектах экспрессионный вектор CAR представляет собой экспрессионный вектор на основе ДНК, такой как плазида, линейный экспрессионный вектор или эписому. В некоторых аспектах вектор содержит дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые облегчают экспрессию CAR, такие как промотор, энхансер, сигнал поли-А и/или один или более интронов. В предпочтительных аспектах CAR фланкируется последовательностями транспозонов так, чтобы присутствие транспозазы обеспечивало возможность интеграции кодирующей последовательности в геном трансфицированной клетки.

[0028] В определенных аспектах клетки дополнительно трансфицируют транспозазой, которая облегчает интеграцию кодирующей CAR последовательности в геном трансфицированных клеток. В некоторых аспектах транспозаза предоставлена в виде экспрессионного вектора на основе ДНК. При этом в предпочтительных аспектах транспозаза предоставлена в виде пригодной для экспрессии РНК или белка так, чтобы в трансгенных клетках не происходила длительная экспрессия транспозазы. В соответствии с вариантами осуществления можно использовать любую систему на основе транспозазы. В других аспектах клетки могут быть инфицированы лентивирусом для облегчения интеграции кодирующей CAR последовательности и кодирующей кинурениназу последовательности в геном клетки.

[0029] В одном варианте осуществления предложена композиция, содержащая кинурениназу или кодирующую кинурениназу нуклеиновую кислоту, для применения при лечении опухоли у субъекта. В другом варианте осуществления предложено применение кинурениназы или кодирующей кинурениназу нуклеиновой кислоты в производстве лекарственного средства для лечения опухоли. Кинурениназа может представлять собой любую кинурениназу по вариантам осуществления.

[0030] Варианты осуществления, обсуждаемые в контексте способов и/или композиций по изобретению, можно применять в отношении любых других способа или композиции, описанных в данном документе. Таким образом, вариант осуществления, касающийся одного способа или одной композиции, можно применять также к другим способам и композициям по изобретению.

[0031] В контексте данного документа выражение «практически не содержит» в отношении указанного компонента подразумевает, что ни один из указанных компонентов не был преднамеренно внесен к композицию и/или он присутствует только как постороннее вещество или в следовых количествах. Общее количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного попадания в композицию предпочтительно составляет менее 0,01%. Наиболее предпочтительна композиция, в которой стандартные аналитические методы не позволяют определить какое-либо количество указанного компонента.

[0032] В контексте описания и формулы изобретения форма единственного числа может означать один или более. В контексте описания и формулы изобретения при использовании в сочетании со словом «содержащий» форма единственного числа может означать один или более одного. В контексте описания и формулы изобретения «другой» или «дополнительный» могут означать по меньшей мере второй или более.

[0033] В контексте описания и формулы изобретения термин «около» используют для указания того, что значение включает неизбежную вариацию

погрешности для устройства, способа, применяемого для определения значения, или вариацию, которая существует среди субъектов исследования.

[0034] Другие цели, признаки и преимущества данного изобретения станут понятны из нижеприведенного подробного описания. При этом следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают определенные варианты осуществления изобретения, приведены исключительно в качестве иллюстрации, так как из этого подробного описания для специалистов в данной области техники станет очевидной возможность проведения различных изменений и модификаций в пределах сущности и объема изобретения.

#### Краткое описание графических материалов

[0035] Нижеприведенные графические материалы составляют часть представленного описания и включены, чтобы дополнительно продемонстрировать определенные аспекты данного изобретения. Изобретение может быть более понятно со ссылкой на одно или более из этих графических изображений в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленным в данном документе.

[0036] Фиг. 1А-С: Успешный результат белковой инженерии HsKYN. А) Человеческие варианты достигали > 500-кратного повышения каталитической активности ( $K_{кат}/K_M$ ) в отношении Kyn по сравнению с полученным с помощью бактериального инструмента киназами. В) В человеческих вариантах значительно улучшена каталитическая стабильность в человеческой сыворотке *in vitro*. С) Человеческие варианты (68) и (153), приведенные в Таблице 1 данного документа, демонстрировали продолжительное разложение Kyn у мышей после одной в/в дозы.

[0037] Фиг. 2А-В: *In vivo* эффективность варианта HsKYN. А) Белок (68) в комбинации с анти-PD-1 демонстрировал существенное ингибирование роста опухоли/преимущества в выживаемости, превосходящие результаты для эпикадостата, в модели СТ26. В) Животных, демонстрировавших полный ответ (ПО) повторно стимулировали СТ26, и ни у одного из животных ПО не развились опухоли, что подтверждает противоопухолевую память против СТ26. В противоположность этому, у наивных мышей, которым инокулировали СТ26, развились опухоли.

[0038] Фиг. 3А-В: Иммунопрофилирование белка (68) у несущих опухоль СТ26 мышей. А) Мультиплексный анализ генной экспрессии с использованием Nanostring выявил повышение регуляции сигнатуры гена IFN $\gamma$  после обработки HsKYN +/- анти-PD1. В) Анализ FACS продемонстрировал, что обработка HsKYN повышала отношения CD8/Treg и M1/M2.

[0039] Фиг. 4А-С: ФК/ФД профили белка (153) у токсикологических видов. А) Белок (153) продемонстрировал сильное и длительное снижение уровней Kyn в плазме у крыс после однократной и повторных еженедельных в/в доз в 10 мг/кг. В) Белок (153) разлагал Kyn в плазме  $\geq 50\%$  в течение до 7 суток после однократной в/в

дозы у яванских макаков. С) ФК-профиль белка (153) у обезьян с благоприятным  $T_{1/2}$  > 6 суток.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

I. Представленные варианты осуществления

[0040] В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложены кинурениназы (киназы), ферменты, снижающие уровни Куп. В частности, в данной заявке предложен набор вариантов человеческой кинурениназы, которые проявляют по меньшей мере в 100 раз большую каталитическую активность в отношении разложения кинуренина по сравнению с человеческим ферментом кинурениназы дикого типа. В некоторых аспектах предложенные в данном документе варианты кинурениназы дополнительно имеют повышенную устойчивость к дезактивации в сыворотке. Поскольку эти ферменты имеют существенно улучшенные свойства, это делает их идеальными для терапевтического вмешательства при заболевании, например, при лечении рака. В некоторых аспектах ферменты (или последовательности, кодирующие ферменты) можно использовать для лечения онкологических пациентов, например, имеющих опухоли с экспрессией ИДО1 и/или ТДО2.

[0041] В представленных исследованиях была успешно сконструирована человеческая киназа (h-KYNase), проявляющая существенно улучшенную каталитическую активность и стабильность в отношении Куп по сравнению с ферментом ДТ, и достигнуто длительное снижение уровней Куп в плазме мышей. Также была продемонстрирована эффективность одного агента и комбинации с PD1 в моделях СТ26 и В16-ИДО, превосходящая результаты для основного ингибитора ИДО1 эпикадостата, а полученные в результате животные с полным ответом (ПО) были устойчивы к повторной опухолевой стимуляции. Иммунопрофилирование опухоли выявило повышение регуляции экспрессии сигнатуры гена IFN $\gamma$  и соотношения макрофагов M1/M2 после обработки HsKYN +/- PD1. Основным вариант HsKYN демонстрировал благоприятные разложение Куп и ФК-профиль у крыс и отличных от человека приматов, и может использоваться для лечения онкологических заболеваний, таких как онкологические заболевания, в которых пути ИДО1 и/или ТДО2 играют иммуносупрессивную роль.

Определения

[0042] В контексте данного документа термины «белок» и «полипептид» относятся к соединениям, содержащим аминокислоты, соединенные посредством пептидных связей, и используются взаимозаменяемо.

[0043] В контексте данного документа термин «слитый белок» относится к химерному белку, содержащему белки или белковые фрагменты, функционально связанные отличным от нативного образом.

[0044] В контексте данного документа термин «время полужизни» ( $1/2$  жизни) относится ко времени, необходимому, чтобы концентрация полипептида

уменьшилась вполовину *in vitro* или *in vivo*, например, после инъекции млекопитающему.

[0045] Термины «в функциональной комбинации», «в функциональном порядке» и «функционально связанные» относятся к связи, в которой описанные подобным образом компоненты находятся во взаимосвязи, которая позволяет им функционировать предусмотренным образом, например, такой связи последовательностей нуклеиновых кислот, чтобы молекула нуклеиновой кислоты могла управлять транскрипцией заданного гена и/или синтезом необходимой белковой молекулы, или такой связи аминокислотных последовательностей, чтобы происходило образование слитого белка.

[0046] Подразумевается, что термин «линкер» относится к соединению или фрагменту, которые действуют как молекулярный мостик, функционально соединяя две разные молекулы, причем одна часть линкера функционально связана с первой молекулой, а другая часть линкера функционально связана со второй молекулой.

[0047] Термин «ПЭГилированный» относится к конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ), который широко используется в качестве носителя лекарственных веществ благодаря своей высокой степени биосовместимости и легкости модификации. ПЭГ может быть сопряжен (например, ковалентно связан) с активными агентами посредством гидроксигрупп на конце цепи ПЭГ химическими методами; однако сам ПЭГ ограничен максимум двумя активными агентами на молекулу. В другом подходе использовали сополимеры ПЭГ и аминокислот в качестве нового биоматериала, который сохраняет биосовместимость ПЭГ, но имеет дополнительное преимущество наличия многочисленных точек присоединения (что, таким образом, обеспечивает большую нагрузку лекарственным веществом), и который можно конструировать синтетически для соответствия ряду применений.

[0048] Термин «ген» относится к последовательности ДНК, которая содержит регуляторные и кодирующие последовательности, необходимые для выработки полипептида или его предшественника. Полипептид может кодироваться полноразмерной кодирующей последовательностью или любой частью кодирующей последовательности так, чтобы сохранить необходимую ферментативную активность.

[0049] Термин «нативный» относится к типичной форме гена, генного продукта или характеристике этого гена или генного продукта при выделении из источника природного происхождения. Нативной формой является та, которая наиболее часто встречается в природной популяции и, таким образом, условно обозначает нормальную форму или форму дикого типа. В противоположность этому, термин «модифицированный», «вариантный» или «мутантный» относится к гену или генному продукту, который имеет модификацию в последовательности и функциональных свойствах (т. е. измененные характеристики) по сравнению с нативным геном или генным продуктом.

[0050] Термин «вектор» используется для обозначения носителя молекулы нуклеиновой кислоты, в который можно вставлять последовательность нуклеиновой кислоты для внесения в клетку, где она может реплицироваться. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть «экзогенной», что означает, что она является чужеродной для клетки, в которую вносят вектор, или же, что эта последовательность является гомологичной последовательности в клетке, но находится в положении в нуклеиновой кислоте клетки-хозяина, в котором обычно эта последовательность не находится. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, ДИХ). Специалист в данной области техники сможет сконструировать вектор посредством стандартных рекомбинантных технологий.

[0051] Термин «экспрессионный вектор» относится к любому типу генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, пригодную для транскрипции. В некоторых случаях молекулы РНК затем транслируются в белок, полипептид или пептид. В других случаях последовательности не транслируются, например, при получении антисмысловых молекул или рибозимов. Экспрессионные векторы могут содержать ряд «регуляторных последовательностей», которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Помимо регуляторных последовательностей, которые управляют транскрипцией и трансляцией, векторы и экспрессионные векторы могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые выполняют также и другие функции и описаны выше.

[0052] В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству клеток и/или терапевтической композиции (такой как терапевтический полинуклеотид и/или терапевтический полипептид), используемому в способах для достижения терапевтического эффекта. Используемые в данной заявке термины «терапевтическая польза» или «терапевтически эффективный» относятся к чему-либо, что способствует хорошему самочувствию субъекта или повышает его, в отношении медицинского лечения этого патологического состояния. Это включает, но не ограничивается этим, снижение частоты или тяжести признаков или симптомов заболевания. Например, лечение онкологического заболевания может включать уменьшение размера опухоли, снижение инвазивности опухоли, снижение скорости роста раковой опухоли или предотвращение метастазирования. Лечение онкологического заболевания также может относиться к продлению времени жизни субъекта с онкологическим заболеванием.

[0053] В контексте данного документа термин « $K_M$ » относится к константе Михаэлиса - Ментен для фермента и определяется как концентрация конкретного

субстрата, при которой фермент достигает половины своей максимальной скорости в катализируемой ферментом реакции. В контексте данного документа термин « $k_{\text{кат}}$ » относится к числу оборота или числу молекул субстрата, которое каждый ферментный сайт превращает в продукт в единицу времени, и при котором фермент работает с максимальной эффективностью. В контексте данного документа термин « $k_{\text{кат}}/K_M$ » представляет константу специфичности, которая является мерой того, насколько эффективно фермент превращает субстрат в продукт.

[0054] В контексте данного документа термин «химерные антигенные рецепторы (CAR, англ. «chimeric antigen receptor»)» может относиться, например, к искусственным Т-клеточным рецепторам, химерным Т-клеточным рецепторам или химерным иммунорецепторам, и охватывает сконструированные рецепторы, которые придают искусственную специфичность для конкретной иммунной эффекторной клетки. CAR можно использовать для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке, тем самым обеспечивая возможность генерации большого количества специфических Т-клеток, например, для применения в адоптивной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления CAR, например, определяют специфичность клетки в отношении опухолеассоциированного антигена. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат внутриклеточный домен активации, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий область связывания опухолеассоциированного антигена. В конкретных аспектах CAR содержат слияния одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител (например, описанных в патенте США № 7109304, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки), слитых с трансмембранным и эндодоменами CD3-дзета. Специфичность других конструкций CAR может быть получена от лигандов или рецепторов (например, пептидов) или от паттерн-распознающих рецепторов, таких как дектины. В конкретных вариантах осуществления можно осуществлять нацеливание на злокачественные В-клетки путем перенаправления специфичности Т-клеток, используя CAR, специфические в отношении молекулы В-клеточной линии дифференцировки, CD19. В определенных случаях положение антиген-распознающего домена можно модифицировать для снижения индуцированной активацией клеточной гибели. В определенных случаях CAR содержат домены для дополнительной костимулирующей сигнализации, такие как CD3-дзета, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 и/или OX40. В некоторых случаях вместе с CAR можно коэкспрессировать некоторые молекулы, включая костимулирующие молекулы, репортерные гены для визуализации (например, для позитронно-эмиссионной томографии), генные продукты, которые в определенных условиях снижают количество Т-клеток после добавления про-лекарственного вещества, «хоминг»-рецепторы, хемокины, рецепторы хемокинов, цитокины и рецепторы цитокинов.

[0055] «Лечение» относится к введению субъекту или применению к нему терапевтического агента или проведению процедуры или терапевтического воздействия в отношении субъекта в целях получения терапевтической пользы в отношении заболевания или связанного со здоровьем состояния. Например, лечение может включать введение фармацевтически эффективного количества кинурениназы.

[0056] «Субъект» или «пациент» относится к человеку или отличному от человека животному, такому как приматы, млекопитающие и позвоночные. В конкретных вариантах осуществления субъект является человеком.

#### Полипептиды кинурениназы

[0057] Некоторые варианты осуществления относятся к модифицированным белкам и полипептидам. Конкретные варианты осуществления относятся к модифицированному белку или полипептиду, который проявляет по меньшей мере один вид функциональной активности, сравнимый с немодифицированной версией, предпочтительно активности разложения кинуренина. В дополнительных аспектах белок или полипептид может быть дополнительно модифицирован для повышения стабильности в сыворотке. Таким образом, когда в данной заявке упоминается функция или активность «модифицированного белка» или «модифицированного полипептида», специалист в данной области техники должен понимать, что это включает, например, белок или полипептид, который обладает дополнительным преимуществом по сравнению с немодифицированным белком или полипептидом, таким как активность разложения кинуренина или термодинамическая стабильность.

[0058] Определение активности можно проводить, используя методы анализа, известные специалистам в данной области техники, в частности, в отношении активности белка, и может включать в целях сравнения применение нативной и/или рекомбинантной версий модифицированного или немодифицированного белка или полипептида.

[0059] В определенных вариантах осуществления модифицированный полипептид, такой как модифицированная кинурениназа, можно идентифицировать на основании его повышения в кинуренине. Например, можно идентифицировать сайты распознавания субстрата немодифицированного полипептида. Эта идентификация может быть основана на структурном анализе или анализе гомологии. Можно создавать популяцию мутантов, содержащих модификации таких сайтов распознавания субстрата. В дополнительном варианте осуществления из мутантной популяции можно отбирать мутантов с повышенной активностью разложения кинуренина. Отбор необходимых мутантов может включать способы, такие как обнаружение побочных продуктов или продуктов разложения кинуренина.

[0060] Модифицированные белки могут содержать делеции и/или замены аминокислот; таким образом, белок с делецией, белок с заменой и белок с делецией и заменой представляют собой модифицированные белки. В некоторых вариантах



осуществления модифицированные белки могут дополнительно содержать вставки или добавленные аминокислоты, например, как в случае со слитыми белками или белками с линкерами. В «модифицированном белке с делецией» отсутствуют один или более остатков нативного белка, но при этом он может обладать специфичностью и/или активностью нативного белка. «Модифицированный белок с делецией» также может иметь сниженную иммуногенность или антигенность. Примером модифицированного белка с делецией является белок, в котором был удален аминокислотный остаток из по меньшей мере одной антигенной области, то есть области белка, определенной как антигенная в конкретном организме, таком как организм, которому можно вводить модифицированный белок.

[0061] Варианты с заменами или замещениями, как правило, содержат замену одной аминокислоты на другую в одном или более сайтах в белке и могут быть сконструированы для модуляции одного или более свойств полипептида, в частности, его эффекторных функций и/или биодоступности. Замены могут быть или не быть консервативными, что означает, что одна аминокислота замещена другой со схожими формой и зарядом. Консервативные замены хорошо известны в данной области техники и включают, например, замены: аланина на серин; аргинина на лизин; аспарагина на глутамин или гистидин; аспартата на глутамат; цистеина на серин; глутамина на аспарагин; глутамата на аспартат; глицина на пролин; гистидина на аспарагин или глутамин; изолейцина на лейцин или валин; лейцина на валин или изолейцин; лизина на аргинин; метионина на лейцин или изолейцин; фенилаланина на тирозин, лейцин или метионин; серина на треонин; треонина на серин; триптофана на тирозин; тирозина на триптофан или аланин; и валина на изолейцин или лейцин.

[0062] Помимо делеции или замены модифицированный белок может содержать вставку остатков, которая, как правило, включает добавление по меньшей мере одного остатка в полипептид. Это может включать вставку нацеливающего пептида или полипептида или просто одного остатка. Концевые добавления, называемые слитыми белками, обсуждаются ниже.

[0063] Термин «биологически функциональный эквивалент» хорошо известен в данной области техники и дополнительно подробно определен в данном документе. Соответственно, включены последовательности, которые имеют от около 70% до около 80%, или от около 81% до около 90%, или даже от около 91% до около 99% аминокислот, которые идентичны или функционально эквивалентны аминокислотам контрольного полипептида, при условии сохранения биологической активности белка. Модифицированный белок может быть биологически функционально эквивалентным своему нативному аналогу в определенных аспектах.

[0064] Также следует понимать, что аминокислотные и нуклеотидные последовательности могут содержать дополнительные остатки, такие как дополнительные N- или C-концевые аминокислоты или 5' или 3'

последовательности, и при этом быть по существу такими же, как одна из раскрытых в данном документе последовательностей, при условии, что последовательность соответствует приведенным выше критериям, включая сохранение биологической белковой активности, под чем подразумевается белковая экспрессия. Добавление концевых последовательностей, в частности, применимо к последовательностям нуклеиновых кислот, которые могут, например, включать различные некодирующие последовательности, фланкирующие любую из 5' или 3' частей кодирующей области, или могут включать различные внутренние последовательности, т. е. интроны, которые, как известно, встречаются в генах.

[0065] В определенных вариантах осуществления кинурениназа в соответствии с вариантами осуществления содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную кинурениназе по SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В дополнительных аспектах кинурениназа является по меньшей мере на около 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной кинурениназе по SEQ ID NO: 1, 2 или 3 и содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из L8P, K38E, Y47L, I48F, K50Q, I51M, S60N, K64N, D65G, E66K, N67D, N67P, D67S, A68F, A68T, A68V, F71L, F71M, L72N, K84E, E88N, E89K, E89S, E90Q, D92E, K93N, K93T, A95H, A95Q, K96N, I97H, I97L, I97V, A98G, A99G, A99I, A99R, A99S, A99T, A99V, Y100N, Y100S, Y100T, G101A, H102W, E103F, E103H, E103N, E103Q, E103R, E103V, E103W, V104D, V104E, V104F, V104H, V104K, V104L, V104R, G105A, G105H, G105S, G105T, E106D, K106D, K106E, K106H, K106N, R107P, R107S, P108R, I110A, I110F, I110L, I110M, I110T, T111D, T111H, T111N, T111R, G112A, G112C, G112D, G112K, G112L, G112M, G112Q, G112R, G112S, G112T, G112Y, N127K, I131V, A132V, L133V, A136T, L137T, T138S, N140D, H142Q, Q14R, Y156H, K163T, D168E, H169R, Q175L, I183F, I183L, I183P, I183S, E184A, E184D, E184R, E184T, E184V, E185T, M187L, M189I, K191A, K191G, K191H, K191M, K191N, K191R, K191S, K191T, K191W, E197A, E197D, E197F, E197K, E197M, E197Q, E197S, E197T, E197V, I201C, I201E, I201F, I201H, I201L, I201S, I201T, I201V, H203K, L219M, L219W, F220L, V223I, F225Y, H230F, H230L, H230Y, N232S, Y246F, F249W, D250E, S274A, S274C, S274G, S274N, S274T, L278M, A280G, A280S, A280T, G281S, A282M, A282P, G284N, I285L, V303L, V303S, F306W, F306Y, S311N, K315E, D317E, D317K, I331C, I331L, I331N, I331S, I331T, I331V, N333T, P334N, P335T, L337T, L338A, L338Q, S341I, K373E, K373N, N375A, N375H, Y376C, Y376F, Y376L, K378G, K378P, K378Q, K378R, K380G, K380S, A382G, A382R, A382T, T383S, K384G, K384N, P386K, P386S, V387L, N389E, I405L, F407Y, S408D, S408N, N411R, D413S, D413V, Q416T, E419A, E419L, K420E, R421N, V424I, K427M, N429E, G432A и A436T. В дополнительных аспектах кинурениназа является по меньшей мере на около 80%, 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной одной из кинурениназ, приведенных в Таблице 1. В конкретных аспектах кинурениназа выбрана из одной из приведенных в Таблице 1. В некоторых аспектах кинурениназа, например, в соответствии с Таблицей 1, может быть или не быть ПЭГилированной.

[0066] Ниже в Таблице 1 приведены различные ферменты кинурениназы, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами по данному изобретению. Хотя он явным образом не приведен в Таблице 1, в данном документе «белок (1)» относится к кинурениназе человека дикого типа, аминокислотная последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 1.

Таблица 1: Примеры ферментов кинурениназы из вариантов осуществления.

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
2	9	N67D/L72N/E103Q/M189I/F225Y/S274G/I331V/I405L/S408N	His	НЕТ
3	9	N67D/L72N/E103Q/M189I/F225Y/S274G/I331V/I405L/S408N	His	ДА
4	7	A99I/G112A/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
5	7	A99I/G112A/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	ДА
6	10	Q14R/A99I/G112A/M189I/H230Y/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
7	10	Q14R/A99I/G112A/M189I/H230Y/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	ДА
8	17	N67D/L72N/E103Q/A99I/G112A/M189I/F225Y/S274G/I331V/F306Y/K380S/A382R/K384N/P386K/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
9	17	N67D/L72N/E103Q/A99I/G112A/M189I/F225Y/S274G/I331V/F306Y/K380S/A382R/K384N/P386K/I405L/S408N/A436T	His	ДА
10	18	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/A136T/M189I/F225Y/S274G/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
11	27	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/I131V/L133V/A136T/T138S/M189I/F225Y/G274T/L278M/G281S/A282P/F306W/K315E/D317E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
12	25	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
13	25	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N	His	ДА

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГилование
		333T/S341I/I405L/S408N		
14	8	A99I/G112A/G284N/I285L/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
15	7	A99I/G112A/K191N/F306Y/I331N/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
16	10	L8P/A99I/G112A/Q175L/F306Y/I331N/K373E/K378R/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
17	10	A99I/G112A/F306Y/I331N/K380S/A382R/K384N/P386K/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
18	9	A99I/G112A/F306Y/I331N/N375H/Y376L/K378P/I405L/S408N/A436T	His	НЕТ
19	22	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110L/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/S274G/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
20	23	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/A132V/A136T/M189I/F225Y/G274S/A280S/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
21	23	N67D/F71L/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/G112Y/A136T/M189I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
22		***результаты секвенирования не были полностью расшифрованы***	His	НЕТ
23	26	D67N/A68V/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274T/A280S/G281S/A282P/F306W/K315E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
24	25	<i>D67N/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274S/A280S/G281S/A282P/F306W/K315E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
25	29	<i>N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/V303L/F306W/S311N/K315E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
26	23	<i>D67S/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/A132V/L133V/A136T/M189I/F225Y/G274A/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
27	24	<i>D67N/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274N/L278M/A282P/F306W/K315E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
28	22	<i>D67N/A68V/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/M110I/A136T/M189I/F225Y/G274T/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
29	27	<i>N67D/F71L/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/V223I/F225Y/G274S/A280S/G281S/A282P/F306W/K315E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ
30	25	<i>D67N/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106E/R107S/I110M/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274S/A280S/G281S/A282P/F306W/D317E/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N</i>	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
31	29	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/V223I/M189I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/V303S/F306W/K315E/D317K/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
32	24	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
33	24	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	ДА
34	20	L72N/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/T111H/G112Y/L133V/A136T/F225Y/S274N/A280S/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
35	21	L72N/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/T111N/G112Y/I131V/L133V/A136T/F225Y/S274T/A280S/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
36	22	L72N/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110M/T111N/G112Y/I131V/L133V/A136T/F225Y/S274N/A280S/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
37	22	N67D/F71L/L72N/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110M/T111H/G112Y/A136T/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
38	21	L72N/E90Q/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110M/T111D/G112Y/A136T/F225Y/S274N/A280S/G281S/A282M/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГилование
39	16	Y100T/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/A280G/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
40	19	A99S/Y100S/G101A/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110M/T111H/G112Y/A136T/F225Y/A280T/A282P/F306W/I331C/N333T/K373N	His	НЕТ
41	3	K191S-E197T-I201H	His	НЕТ
42	3	K191R-E197S-I201T	His	НЕТ
43	3	K191S-E197T-I201T	His	НЕТ
44	2	I183P-E184A	His	НЕТ
45	3	K191R-E197F-I201T	His	НЕТ
46	2	K191R-I201E	His	НЕТ
47	3	K191W-E197V-I201E	His	НЕТ
48	3	K191H-E197V-I201E	His	НЕТ
49	2	E197M-I201L	His	НЕТ
50	3	K191G-E197V-I201H	His	НЕТ
51	3	K191T-E197Q-I201E	His	НЕТ
52	3	K191H-E197V-I201E	His	НЕТ
53	25	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/G274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/K373N/I405L/S408N	His	НЕТ
54	22	L72N/E90Q/A99V/Y100N/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110M/T111D/G112Y/A136T/F225Y/S274N/A280S/G281S/A282M/F306W/I331C/N333T/	His	НЕТ



Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
		K373N		
55	37	N67D/A68T/L72N/E88N/E89K/D92E/K93T/A95Q/K96N/I97H/A98G/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110L/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/A280S/A282P/F306W/I331L/N333T/P335T/L338A/S341I/I405L/S408N/E419A/K420E/R421N/V424I	His	НЕТ
56	36 (делеция 10 остатков считается одной мутацией)	Y47L/I48F/K50Q/del51-62/K64N/D65G/E66K/N67P/A68F/L72N/E88N/E89S/E90Q/K93N/K96N/I97L/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110L/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/A280G/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
57	29	Q14R/K38E/I51M/N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110L/T111H/G112Y/N127K/A136T/M189I/K191N/E197T/F225Y/H230F/S274G/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
58	29	S60N/N67D/L72N/K84E/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/Y156H/K163T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
59	26	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
		333T/L338Q/S341I/I405L/S408N		
60	26	N67D/L72N/A99I/Y100N/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
61	27	N67D/L72N/I97V/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/N140D/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
62	28	N67D/A68T/L72N/E90Q/K93N/A95H/K96N/I97L/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/ <i>M110L</i> /T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
63	25	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
64	26	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/D168E/M189I/V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
65	26	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/V223I/F225Y/D250E/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
66	25	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/ <i>M110I</i> /T111H/	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
		G112Y/A136T/D168E/M189I/F225Y/G274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N		
67	25	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/D250E/G274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
68	8	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
69	8	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	ДА
70	9	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T/P334N	His	НЕТ
71	16	L72N/A99I/H102W/E103F/E106D/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/A282P/I331C/N333T/S341I/S408N	His	НЕТ
72	19	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/T111H/G112Y/A136T/M189I/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/I405L/S408N	His	НЕТ
73	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191S/E197T/I201H</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
74	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191R/E197F/I201T</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
75	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/E106D/R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191SW/E197V/I201E</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
76	27	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>E197M/I201L</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
77	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191H/E197V/I201E</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
78	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191R/E197S/I201T</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
79	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191G/E197V/I201H</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
80	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191S/E197T/I201T</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
81	28	N67D/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/ <i>E106D</i> /R107S/M110I/T111H/G112Y/A132V/A136T/M189I/ <b>K191G/E197A/I201E</b> /V223I/F225Y/S274G/A280S/G281S/A282P/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
82	12	L72N/A99S/H102W/E103F/V104K/K106H/R107S/G112Y/A282P/F306W/I331C/N333T	His	НЕТ
83	12	N67D/L72N/A99I/H102W/K106D/S274G/A280S/G281S/A282P/F306W/I331S	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
		/N333T		
84	24	N67D/A68T/L72N/A99I/H102W/E103F/V104E/K106D/R107S/I110L/T111H/G112Y/A136T/M189I/F225Y/S274N/A280S/A282P/F306W/I331C/N333T/S341I/I405L/S408N	His	НЕТ
85	13	L72N/A99I/H102W/E103V/V104E/K106D/R107S/T111H/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
86	12	L72N/A99V/H102W/E103F/V104E/K106N/T111N/A280S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
87	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T/T383S/D413V	His	НЕТ
88	13	L72N/A99I/Y100N/H102W/G112Y/H169R/M187L/Y246F/A282P/F306W/I331S/N333T/A382T	His	НЕТ
89	11	L72N/A99I/H102W/V104R/G105H/R107P/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
90	11	L72N/H102W/E103N/K106D/R107P/T111R/G112Y/A282P/F306W/I331T/N333T	His	НЕТ
91	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T/Y376F/K378Q	His	НЕТ
92	11	L72N/A99I/H102W/G112Y/K191S/E197D/I201E/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
93	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/K191A/I201V/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
94	15	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183P/E184A/M187L/M189I/K191N/E197T/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
95			His	НЕТ
96	15	F71M/L72N/E103F/V104H/G105T/I183P/E184A/M187L/M189I/K191N/E197T/I201T/A280S/A282P/F306Y	His	НЕТ
97	15	F71M/L72N/E103F/V104H/G105T/I183P/E184A/M187L/M189I/K191N/E197T/I201T/A280S/A282P/F306Y	His	ДА
98	7	L72N/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
99	9	L72N/G101A/H102W/G112Y/E184A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
100	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183P/E184A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
101	12	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183L/M189I/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
102	12	L72N/A99I/H102W/G112Y/M187L/M189I/K191R/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
103	13	L72N/A99V/E103Q/H102W/G112Y/I183P/E184A/E197A/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
104	13	L72N/A99I/H102W/E103Q/V104D/G105S/G112Y/I183P/E184A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
105	9	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
106	13	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G112Y/I183P/M189I/K191S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
107	11	L72N/H102W/R107P/G112Y/I183P/E184A/E197A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ

<b>Белок</b>	<b>Число мутаций</b>	<b>Перечень мутаций</b>	<b>Тэг</b>	<b>ПЭГиление</b>
108	11	L72N/A99T/H102W/G112Y/I183P/E184A/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
109	12	L72N/A99I/H102W/G112Y/A136T/L137T/F225Y/A282P/F306W/I331S/N333T/F407Y	His	НЕТ
110	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T/I405L/S408D/A436T	His	НЕТ
111	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183P/E184A/M187L/M189I/K191N/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
112	13	L72N/A99V/H102W/E103Q/G112Y/I183P/E184A/E197A/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
113	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112Y/M187L/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
114	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112Y/M187L/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	ДА
115	14	L72N/H102W/V104D/G105A/G112Y/I183F/E184T/M189I/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
116	14	L72N/A99V/H102W/V104H/G105A/G112Y/M187L/M189I/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
117	14	L72N/A99I/H102W/V104D/G105S/G112Y/I183P/M187L/M189I/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
118	16	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104D/G112Y/I183P/E184A/M189I/K191R/I201T/A280S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ

<b>Белок</b>	<b>Число мутаций</b>	<b>Перечень мутаций</b>	<b>Тэг</b>	<b>ПЭГиление</b>
119	12	L72N/A99I/H102W/E103Q/V104H/G112Y/I183L/M189I/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
120	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183S/E183A/M189I/K191N/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
121	10	L72N/A99I/H102W/G112Y/A136T/L137T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
122	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/A136T/L137T/F220L/F225Y/H230L/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
123	11	L72N/A99I/H102W/G112Y/L137T/F220L/H203K/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
124	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/A136T/L137T/F225Y/A282P/F306W/I331S/N333T/F407Y	His	НЕТ
125	11	L72N/A99I/H102W/R107P/G112Y/I183L/E184A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
126	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105S/R107P/G112Y/M187L/K191R/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
127	15	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183L/E184R/M187L/M189I/K191N/E197K/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
128	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/E184D/M187L/M189I/K191R/E197A/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
129	13	L72N/A99I/H102W/G112Y/I183S/E184V/M187L/M189I/K191R/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ



Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГиление
130	14	L72N/A99V/H102W/V104D/G112Y/E184A/M187L/M189I/K191R/E197A/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
131	15	L72N/A99V/H102W/V104H/G105A/G112Y/M189I/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
132	16	L72N/A99I/H102W/E103Q/V104D/G105S/G112Y/I183P/M189I/K191S/I201T/A280S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
133	13	L72N/A99V/H102W/E103Q/R107P/G112Y/I183P/E184A/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
134	14	L72N/A99T/H102W/E103F/R107P/G112Y/I183P/E184A/I201T/A282P/S724C/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
135	9	L72N/A99V/H102W/R107P/G112Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
136	17	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112Y/M187L/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T/I405L/S408D	His	НЕТ
137	16	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104D/G112Q/I183P/E184A/M189I/K191R/I201T/A280S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
138	14	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
139	17	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112L/M187L/K191S/I201T/F220L/F225Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
140	18	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112L/A136T/M187L/K191S/I201T/H230L/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ

<b>Белок</b>	<b>Число мутаций</b>	<b>Перечень мутаций</b>	<b>Тэг</b>	<b>ПЭГилование</b>
141	18	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112C/M187L/K191S/I201T/F220L/F225Y/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
142	16	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104D/G112R/I183P/E184A/M189I/K191R/I201T/A280S/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
143	12	L72N/A99V/H102W/V104H/G105A/M189I/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
144	12	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104D/R107P/G112C/I201E/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
145	12	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104D/G112L/M187L/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
146	12	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104L/G112D/K191S/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N	His	НЕТ
147	14	L72N/A99I/H102W/E103Q/V104L/G112Y/A136T/K191S/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
148	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104L/R107P/G112Y/A136T/I183P/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
149	14	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/H142Q/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T	His	НЕТ
150	14	L72N/A99I/H102W/E103Q/V104H/G112D/K191S/I201T/F225Y/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N	His	НЕТ

<b>Белок</b>	<b>Число мутаций</b>	<b>Перечень мутаций</b>	<b>Тэг</b>	<b>ПЭГилование</b>
151	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/G112Y/M187L/K191S/I201T/A282P/F306W/I331S/N333T/S408D	His	НЕТ
152	14	L72N/A99G/H102W/E103H/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
153	14	L72N/A99R/H102W/E103R/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
154	14	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
155	13	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
156	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/N140D/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
157	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/I110F/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
158	14	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112L/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
159	14	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112K/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
160	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/T111R/G112R/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
161	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/I183P/L219M/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГилование
		6W/I331S/N333T/S408N/A436T		
162	16	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/G105A/R107P/T111N/Y112A/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
163	19	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/I183P/E184A/M189I/K191R/I201T/L219W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
164	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/D168E/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
165	19	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/I183P/E184A/M189I/K191R/I201T/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
166	15	L72N/A99V/H102W/E103Q/V104H/R107P/G112Y/I183P/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
167	14	Идентичная АК-последовательность с (138)	His	НЕТ
168	15	L72N/A99R/H102W/E103R/V104H/R107P/G112Y/I183P/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
169	15	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
170	15	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/Y112K/I183P/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
171	14	L72N/A99G/H102W/E103W/V104F/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ

Белок	Число мутаций	Перечень мутаций	Тэг	ПЭГилование
172	15	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T И вставка аргинина между P107 и P108	His	НЕТ
173	16	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/P108R/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T - И вставка лейцина между P107 и R108	His	НЕТ
174	14	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/Y112K/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
175	15	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/K191M/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
176	17	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/M189I/I201S/N232S/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
177	18	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/E184A/M189I/K191R/I201F/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
178	17	F71M/L72N/E103F/V104H/G105T/I110T/G112T/I183P/E184A/M187L/M189I/K191N/E197T/I201T/A280S/A282P/F306Y	His	НЕТ
179	22	I183P/E184A/M187L/M189I/K191S/E197T/I201T/N375A/Y376C/K378G/K380G/A382G/K384G/P386S/N411R/D413S/Q416T/E419L/K427M/N429E/G432A/A436T	His	НЕТ
180	19	A99I/G112S/F306Y/I405L/S408N/A436T/I183P/E185T/M189I/K191N/N375H/Y376L/K378P/K380S/A382R/K384N/P386K/V387L/N389E	His	НЕТ
181	13	L72N/A99R/H102W/E103R/V104D/G112M/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ

<b>Белок</b>	<b>Число мутаций</b>	<b>Перечень мутаций</b>	<b>Тэг</b>	<b>ПЭГиление</b>
182	16	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112M/I183P/I201F/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
183	17	L72N/A99G/H102W/E103W/V104H/R107P/G112Y/I183P/M189I/I201C/F249W/A282P/F306W/I331S/N333T/S408N/A436T	His	НЕТ
184	15	L72N/A99R/H102W/E103R/V104H/R107P/G112Y/I183P/A282P/F306W/I331S/N333T/L337T/S408N/A436T	His	НЕТ
185	17	L72N/A99R/H102W/E103R/V104H/R107P/I110A/G112Y/I183P/A280G/A282P/F306W/I331S/N333T/L337T/S408N/A436T	His	НЕТ

### Ферментативное разложение кинуренина для терапии

[0067] В определенных аспектах полипептиды можно использовать для лечения заболеваний, включая онкологические заболевания, которые чувствительны к снижению уровней кинуренина, с помощью ферментов, которые снижают уровни кинуренина, для предотвращения опосредованных опухолью толерогенных эффектов и опосредования вместо этого направленных на уничтожение опухоли провоспалительных ответов. В определенных аспектах кинурениназы предусмотрены для применения при лечении опухолей, экспрессирующих ИДО1, ИДО2 и/или ТДО.

[0068] В определенных аспектах данного изобретения предложена модифицированная кинурениназа для лечения заболеваний, таких как опухоли. В частности, модифицированный полипептид может иметь человеческие полипептидные последовательности и, таким образом, может предотвращать появление аллергических реакций у пациентов-людей, что делает возможным повторное введение доз, и повышать терапевтическую эффективность.

[0069] Опухоли, в случае которых применимы представленные способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, таких как встречаются в солидных опухолях или гематологических опухолях. Типовые солидные опухоли могут включать, но не ограничиваются этим, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, желудка, головного мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, легкого, мочевого пузыря, меланомы, предстательной железы и молочной железы. Типовые гематологические опухоли включают опухоли костного мозга, Т- или В-клеточные злокачественные образования, лейкозы, лимфомы, бластомы, миеломы и т. п. Дополнительные примеры онкологических заболеваний, которые можно лечить, используя предложенные в данном документе способы, включают, но не ограничиваются этим, карциному, лимфому, бластому, саркому, лейкоз, плоскоклеточный рак, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта и стромальный рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак поджелудочной железы, различные типы рака головы и шеи, меланому, поверхностную распространяющуюся меланому, злокачественную меланому с лентиго, акральные лентигозные меланомы, нодулярные меланомы, а также В-клеточную лимфому (включая высокодифференцированную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); малую лимфоцитарную (МЛ) НХЛ;

среднедифференцированную/фолликулярную НХЛ; среднедифференцированную диффузную НХЛ; низкодифференцированную иммунобластную НХЛ; низкодифференцированную лимфобластную НХЛ; низкодифференцированную мелкоклеточную НХЛ с нерассеченными ядрами; НХЛ с массивной лимфаденопатией; мантийноклеточную лимфому; СПИД-ассоциированную лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и хронический миелобластный лейкоз.

[0070] В частности, рак может быть следующего гистологического типа, хотя не ограничивается этим: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантоклеточная и веретенноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базальноклеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходноклеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома, злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденокистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный колиполипоз; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхоальвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулированная склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометриоидная аденокарцинома; карцинома из придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидноклеточная карцинома; инфильтративно-протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Паджета, маммарная; ацинарноклеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома, злокачественная; стромальная опухоль яичника, злокачественная; текома, злокачественная; гранулезоклеточная опухоль, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома из клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; липидноклеточная опухоль, злокачественная; параганглиома, злокачественная; экстрамамиллярная параганглиома, злокачественная; феохромоцитомы; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная



распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в большом пигментированном невусе; эпителиоидноклеточная меланома; синий невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитома, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; мюллерова смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филлоидная опухоль, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; гиперплазия яичника, злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитома, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; церебеллярная саркома; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; опухоль обонятельного нерва; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома, злокачественная; зернистоклеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; ходжкинская лимфома; парагранулема; злокачественная лимфома, малая лимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидный микоз; другие определенные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника; лейкоз; лимфоидный лейкоз; плазмноклеточный лейкоз; эритролейкоз; лимфосаркомно-клеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз.

[0071] В контексте данного документа кинурениназу можно использовать в качестве противоопухолевого агента в ряде способов для снижения уровней кинуренина и/или метаболитов кинуренина в опухолевой ткани или кровотоке млекопитающего с онкологическим заболеванием, или для снижения уровней кинуренина, если это снижение считается необходимым.

[0072] Снижение уровней можно осуществлять *in vivo* в кровотоке млекопитающего, *in vitro* в случаях, когда необходимо снижение уровней кинуренина и/или метаболитов кинуренина в тканевой культуре или других биологических средах, и в *ex vivo* процедурах, в которых биологические жидкости, клетки или ткани обрабатывают вне организма и после этого возвращают в организм пациента-млекопитающего. Снижение уровней кинуренина в кровотоке, культуральной среде, биологических жидкостях или клетках осуществляют для того, чтобы снизить количество кинуренина, доступное для обрабатываемого материала, и следовательно, включает приведение подлежащего снижению материала в контакт со снижающим уровни кинуренина количеством кинурениназы в условиях, обеспечивающих снижение уровней кинуренина, чтобы разложить окружающий кинуренин в приведенном в контакт материале.

[0073] Снижение уровней может быть направлено на источник питания для клеток и не обязательно на сами клетки. Следовательно, в *in vivo* применении обработка опухолевой клетки включает приведение питательной среды для популяции опухолевых клеток в контакт с кинурениназой. В этом варианте осуществления средой может быть кровь, лимфатическая жидкость, спинальная жидкость и подобные жидкости организма, в которых необходимо снижение уровней кинуренина.

[0074] Эффективность снижения уровней кинуренина и/или метаболитов кинуренина может сильно варьироваться в зависимости от применения и, как правило, зависит от количества кинуренина, присутствующего в материале, необходимой скорости снижения и стойкости материала к воздействию кинурениназы. Уровни кинуренина и метаболитов кинуренина в материале и, следовательно, скорость снижения уровней кинуренина и метаболитов кинуренина в материале легко можно отслеживать с помощью ряда химических и биохимических способов, хорошо известных в данной области техники. Типовые снижающие уровни кинуренина количества дополнительно описаны в данном документе и могут находиться в диапазоне от 0,001 до 100 единиц (Е) кинурениназы, предпочтительно от около 0,01 до 10 Е и более предпочтительно от около 0,1 до 5 Е кинурениназы на миллилитр (мл) подлежащего обработке материала. Типичные дозировки можно вводить с учетом массы тела, при этом они находятся в диапазоне около 5-1000 Е/килограмм (кг)/сутки, предпочтительно около 5-100 Е/кг/сутки, более предпочтительно около 10-50 Е/кг/сутки и более предпочтительно около 20-40 Е/кг/сутки.

[0075] Обеспечивающие снижение уровней кинуренина условия представляют собой связанные с буфером и температурой условия, которые совместимы с биологической активностью кинурениназы, и включают умеренные условия температуры, содержания соли и рН, совместимые с ферментом, например, физиологические условия. Типовые условия включают температуру около 4-40 °С,

ионную силу, равную от около 0,05 до 0,2 М NaCl, и рН от около 5 до 9, что включает и физиологические условия.

[0076] В конкретном варианте осуществления в изобретении предусмотрены способы применения кинурениназы в качестве противоопухолевого агента и, следовательно, оно включает приведение популяции опухолевых клеток в контакт с терапевтически эффективным количеством кинурениназы в течение периода времени, достаточного для ингибирования роста опухолевых клеток.

[0077] Терапевтически эффективное количество кинурениназы представляет собой predetermined количество, рассчитанное для достижения необходимого эффекта, т. е. снижения уровней кинуренина в опухолевой ткани или в кровотоке пациента, и, таким образом, опосредования направленного на уничтожение опухоли провоспалительного ответа. Таким образом, диапазоны дозировок для введения кинурениназы по изобретению являются достаточно большими для обеспечения необходимого эффекта, состоящего в уменьшении симптомов деления опухолевых клеток и клеточного цикла. Дозировка не должна быть слишком большой, чтобы не вызывать нежелательные побочные явления, такие как синдром сгущения крови, отек легких, застойная сердечная недостаточность, неврологические эффекты и т. п. В общем случае дозировка будет варьироваться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания пациента и может быть определена специалистом в данной области техники. В случае любых осложнений дозировка может быть скорректирована лечащим врачом.

[0078] Кинурениназу можно вводить парентерально путем инъекции или путем постепенной инфузии в течение некоторого времени. Кинурениназу можно вводить внутривенно, внутривентриально, перорально, внутримышечно, подкожно, внутривентриальным образом, трансдермально, дермально, можно доставлять перистальтическими методами, можно инъецировать непосредственно в ткань, содержащую опухолевые клетки, или можно вводить с помощью насоса, подсоединенного к катетеру, который может содержать потенциальный биосенсор для кинуренина.

[0079] Терапевтические композиции, содержащие кинурениназу, традиционно вводят внутривенно, например, путем инъекции единичной дозы. Термин «единичная доза», употребляемый в отношении терапевтической композиции, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичной дозировки для субъекта, причем каждая единица содержит predetermined количество активного материала, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект, вместе с необходимым разбавителем, т. е. носителем или базовым раствором.

[0080] Композиции вводят способом, совместимым с дозированной формой и в терапевтически эффективном количестве. Предназначенное для введения количество зависит от подлежащего лечению субъекта, способности системы

субъекта использовать активный ингредиент и степени необходимого терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, которые необходимо вводить, зависят от решения практикующего врача и являются своими для каждого индивида. При этом подходящие диапазоны дозировок для системного применения раскрыты в данном документе и зависят от пути введения. Также предусмотрены подходящие схемы для начального введения и бустерного введения, типичным примером которых является начальное введение, за которым следуют повторные дозы с интервалом в один или более часов посредством следующей инъекции или введения другого типа. Примеры многократного введения описаны в данном документе и являются исключительно предпочтительными для поддержания постоянных, высоких сывороточных и тканевых уровней кинурениназы и, наоборот, низких сывороточных и тканевых уровней кинуренина. В альтернативном варианте предусмотрена непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в диапазонах, определенных для *in vivo* терапии.

#### Конъюгаты

[0081] Композиции и способы по данному изобретению содержат модифицированные кинурениназы, например, за счет образования конъюгатов с сегментами гетерологичных пептидов или полимерами, такими как полиэтиленгликоль. В дополнительных аспектах кинурениназы могут быть связаны с ПЭГ для повышения гидродинамического радиуса фермента и, следовательно, увеличения времени нахождения в сыворотке. В определенных аспектах раскрытый полипептид может быть конъюгирован с любым нацеливающим агентом, таким как лиганд, обладающий способностью специфически и стабильно связываться с внешним рецептором или сайтом связывания опухолевой клетки (публикация патента США 2009/0304666).

#### Слитые белки

[0082] Определенные варианты осуществления данного изобретения относятся к слитым белкам. Эти молекулы могут содержать нативную или модифицированную кинурениназу, связанную в N- или C-конце с гетерологичным доменом. Например, в слияниях также могут использоваться лидерные последовательности от других видов для обеспечения рекомбинантной экспрессии белка в гетерологичном хозяине. Другой применимый вид слияния включает добавление белкового аффинного тэга, такого как аффинный тэг сывороточного альбумина или шесть остатков гистидина, или иммунологически активного домена, такого как эпитоп антитела, предпочтительно отщепляемых, для облегчения очистки слитого белка. Неограничивающие аффинные тэги включают полигистидин, хитин-связывающий белок (СВР), мальтозо-связывающий белок (МВР) и глутатион-S-трансферазу (GST).

[0083] В конкретном варианте осуществления кинурениназа может быть связана с пептидом, который повышает *in vivo* время полужизни, таким как

полипептид XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), Fc-домен IgG, альбумин или альбумин-связывающий белок.

[0084] Способы создания слитых белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие белки можно получать, например, посредством синтеза *de novo* полного слитого белка или путем присоединения последовательности ДНК, кодирующей гетерологичный домен, с последующей экспрессией интактного слитого белка.

[0085] Получение слитых белков, которые имеют функциональную активность родительских белков, можно облегчить за счет соединения генов с мостиковым сегментом ДНК, кодирующим пептидный линкер, который помещается между соединенными в тандем полипептидами. Линкер должен иметь достаточную длину, чтобы обеспечить правильное сворачивание получаемого в результате слитого белка.

#### ПЭГилирование

[0086] В определенных аспектах изобретения раскрыты способы и композиции, относящиеся к ПЭГилированию кинурениназы. Например, кинурениназа может быть ПЭГилирована в соответствии с раскрытыми в данном документе способами.

[0087] ПЭГилирование представляет процесс ковалентного присоединения полимерных цепей поли(этиленгликоля) к другой молекуле, обычно лекарственного препарата или терапевтического белка. ПЭГилирование обычно осуществляют путем инкубации реакционноспособного производного ПЭГ с целевой макромолекулой. Ковалентное присоединение ПЭГ к лекарственному препарату или терапевтическому белку может «маскировать» агент от иммунной системы хозяина (снижение иммуногенности и антигенности) или повышать гидродинамический размер (размер в растворе) агента, что продлевает время нахождения в циркуляции, снижая почечный клиренс. ПЭГилирование также может обеспечивать водорастворимость гидрофобных лекарственных препаратов и белков.

[0088] Первым этапом ПЭГилирования является подходящая функционализация полимера ПЭГ в одном или обоих концах. ПЭГ, активируемые в каждом конце одним и тем же реакционноспособным фрагментом, известны как «гомобифункциональные», тогда как в случае присутствия разных функциональных групп производное ПЭГ называется «гетеробифункциональным» или «гетерофункциональным». Химически активные или активируемые производные полимера ПЭГ готовят для присоединения ПЭГ к необходимой молекуле.

[0089] Выбор подходящей функциональной группы для производного ПЭГ учитывает тип доступной реакционноспособной группы на молекуле, которая должна быть сопряжена с ПЭГ. В случае белков типичные реакционноспособные аминокислоты включают лизин, цистеин, гистидин, аргинин, аспарагиновую

кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин и тирозин. Также можно использовать N-концевую аминогруппу и C-концевую карбоновую кислоту.

[0090] Методики, используемые для получения первой генерации производных ПЭГ в общем случае состоят в проведении реакции между полимером ПЭГ и группой, способной к реакции с гидроксильными группами, как правило, ангидридами, кислыми хлоридами, хлорформиатами и карбонатами. В химических реакциях ПЭГилирования второй генерации более эффективные функциональные группы, такие как альдегиды, сложные эфиры, амиды и т. д., делают доступными для конъюгации.

[0091] Так как применения ПЭГилирования становятся все более и более технологичными и сложными, существует повышенная необходимость в гетеробифункциональных ПЭГ для конъюгации. Такие гетеробифункциональные ПЭГ очень удобны для связывания двух компонентов в случае необходимости гидрофильного, гибкого и биосовместимого спейсера. Предпочтительными концевыми группами гетеробифункциональных ПЭГ являются малеимиды, винилсульфоны, пиридилдисульфиды, амины, карбоновые кислоты и сложные эфиры NHS.

[0092] Наиболее распространенные агенты для модификации или линкеры основаны на молекулах метоксиПЭГ (мПЭГ). Их активность зависит от добавления белок-модифицирующей группы к спиртовому концу. В некоторых случаях в качестве молекулы-предшественника используют полиэтиленгликоль (ПЭГ-диол). После этого диол модифицируют в обоих концах с целью получения гетеро- или гомодимерной ПЭГ-связанной молекулы.

[0093] В общем случае белки ПЭГилированы в нуклеофильных сайтах, таких как непротонированные тиолы (остатки цистеинила) или аминогруппы. Примеры цистеинил-специфических реагентов для модификации включают ПЭГ-малеимид, ПЭГ-йодоацетат, ПЭГ-тиолы и ПЭГ-винилсульфон. Все четыре являются сильно цистеинил-специфическими в мягких условиях и нейтральными в отношении немного щелочного pH, но каждый имеет некоторые недостатки. Тиоэфир, образуемый с малеимидами, может быть несколько нестабильным в щелочных условиях, поэтому могут существовать некоторые ограничения в отношении вариантов разработки составов с этим линкером. Карбамотиоатная связь, образуемая с йодо-ПЭГ, является более стабильной, но свободный йод может модифицировать остатки тирозина в некоторых условиях. ПЭГ-тиолы образуют дисульфидные связи с тиолами белков, но эта связь также может быть нестабильной в щелочных условиях. Реакционная способность ПЭГ-винилсульфона является относительно медленной по сравнению с малеимид- и йодо-ПЭГ; однако образуемая тиоэфирная связь является довольно стабильной. Медленная скорость реакции также может облегчить контроль реакции ПЭГ-винилсульфона.

[0094] Сайт-специфическое ПЭГилирование в нативных остатках цистеинила проводят редко, поскольку эти остатки обычно находятся в форме дисульфидных связей или необходимы для биологической активности. С другой стороны, можно использовать сайт-направленный мутагенез для включения сайтов ПЭГилирования цистеинила для тиол-специфических линкеров. Мутация цистеина должна быть разработана так, чтобы он был доступен для реагента для ПЭГилирования и оставался биологически активным после ПЭГилирования.

[0095] Агенты для амин-специфической модификации включают ПЭГ-сложный эфир NHS, ПЭГ-третилат, ПЭГ-альдегид, ПЭГ-изотиоцианат и несколько других. Все вступают в реакцию в мягких условиях и очень специфичны в отношении аминокрупп. ПЭГ-сложный эфир NHS, возможно, является одним из наиболее реакционноспособных агентов; однако его высокая реакционная способность может затруднить контроль реакции ПЭГилирования при крупномасштабном производстве. ПЭГ-альдегид образует имин с аминокруппой, который затем восстанавливается до вторичного амина цианоборгидридом натрия. В отличие от боргидрида натрия, цианоборгидрид натрия не восстанавливает дисульфидные связи. Однако это химическое вещество является очень токсичным и работать с ним следует аккуратно, в частности, при более низком pH, когда он становится летучим.

[0096] Вследствие наличия большого количества остатков лизина на большинстве белков сайт-специфическое ПЭГилирование может быть проблемой. К счастью, поскольку эти реагенты могут вступать в реакцию с непротонированными аминокруппами, можно направлять ПЭГилирование на аминокруппы с более низким pH путем проведения реакции при более низком pH. В общем случае pH альфа-аминокрупп на 1-2 единицы pH ниже, чем для эpsilon-аминокрупп остатков лизина. Путем ПЭГилирования молекулы при pH 7 или ниже можно достичь высокой избирательности в отношении частоты N-конца. Однако это выполнимо, только если N-концевая часть белка не нужна для биологической активности. При этом фармакокинетическая польза ПЭГилирования часто перевешивает существенную потерю *in vitro* биоактивности, давая в результате продукт с намного большей *in vivo* биоактивностью вне зависимости от химии ПЭГилирования.

[0097] Существует несколько параметров, которые необходимо учитывать при разработке процедуры ПЭГилирования. К счастью, обычно это не более чем четыре или пять ключевых параметров. Подход «дизайна экспериментов» для оптимизации условий ПЭГилирования может быть очень полезен. В случае тиол-специфических реакций ПЭГилирования параметры, которые необходимо учитывать, включают: концентрацию белка, отношение ПЭГ к белку (на молярном основании), температуру, pH, время реакции и, в некоторых случаях, исключение кислорода. (Кислород может участвовать в образовании межмолекулярных дисульфидов белком, что будет снижать выход ПЭГилированного продукта.) Те же факторы

необходимо учитывать (за исключением кислорода) в случае амин-специфической модификации, за исключением того, что рН может быть даже более критическим, в частности, при нацеливании на N-концевую аминокислотную группу.

[0098] В случае как амин-, так и тиол-специфических модификаций условия реакции могут влиять на стабильность белка. Это может ограничивать температуру, концентрацию белка и рН. Кроме того, реакционная способность ПЭГ-линкера должна быть известна до начала реакции ПЭГилирования. Например, если агент для ПЭГилирования является активным только на 70 процентов, количество используемого ПЭГ должно гарантировать, что в стехиометрии реакции соединения белка и ПЭГ учтены только активные молекулы ПЭГ.

#### Белки и пептиды

[0099] В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к новым композициям, содержащим по меньшей мере один белок или пептид, такой как кинурениназа. Эти пептиды могут содержаться в слитом белке или быть конъюгированы к агенту, как описано выше.

[00100] В контексте данного документа белок или пептид в общем случае относятся, но не ограничиваются этим, к белку из более чем около 200 аминокислот, вплоть до полноразмерной последовательности, транслированной с гена; полипептиду из более чем около 100 аминокислот; и/или пептиду из от около 3 до около 100 аминокислот. Для удобства термины «белок», «полипептид» и «пептид» взаимозаменяемо используются в данном документе.

[00101] В контексте данного документа «аминокислотный остаток» относится к любой аминокислоте природного происхождения, любому производному аминокислоты или любой имитирующей аминокислоту молекуле, известным в данной области техники. В определенных вариантах осуществления остатки белка или пептида являются последовательными без каких-либо отличных от аминокислот соединений, прерывающих последовательность из аминокислотных остатков. В других вариантах осуществления последовательность может содержать один или более отличных от аминокислот фрагментов. В конкретных вариантах осуществления последовательность остатков белка или пептида может прерываться одним или более отличными от аминокислот фрагментами.

[00102] Соответственно, термин «белок или пептид» охватывает аминокислотные последовательности, содержащие по меньшей мере одну из 20 стандартных аминокислот, встречающихся в белках природного происхождения, или по меньшей мере одну модифицированную или нестандартную аминокислоту.

[00103] Белки или пептиды можно получать любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая экспрессию белков, полипептидов или пептидов с помощью стандартных методик молекулярной биологии, выделение белков или пептидов из природных источников или химический синтез белков или пептидов. Нуклеотидные и белковые, полипептидные и пептидные



последовательности, соответствующие различным генам, были раскрыты ранее, и их можно найти в компьютерных базах данных, известных специалистам в данной области техники. Одними из таких баз данных являются базы данных Genbank и GenPept Национального центра биотехнологической информации (доступные по интернет-адресу [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)). Кодированные области для известных генов можно амплифицировать и/или экспрессировать, используя раскрытые в данном документе методики или как известно специалистам в данной области техники. В альтернативном варианте специалистам в данной области техники известны различные коммерческие препараты белков, полипептидов и пептидов.

#### Нуклеиновые кислоты и векторы

[00104] В определенных аспектах изобретения могут быть раскрыты последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие кинурениназу или слитый белок, содержащий кинурениназу. В зависимости от того, какая экспрессионная система используется, последовательности нуклеиновых кислот можно выбирать на основании традиционных способов. Например, если кинурениназа получена из кинурениназы человека и содержит некоторое количество кодонов, которые редко используются в *E. coli*, это может мешать экспрессии. Следовательно, соответствующие гены или их варианты могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в *E. coli*. Также для экспрессии представляющего интерес белка можно использовать различные векторы. Типовые векторы включают, но не ограничиваются этим, плазмидные векторы, вирусные векторы, транспозон или векторы на основе липосом.

#### Клетки-хозяева

[00105] Клетками-хозяевами могут быть любые клетки, которые можно трансформировать для обеспечения экспрессии и секреции кинурениназы и ее конъюгатов. Клетки-хозяева могут представлять собой клетки бактерий, млекопитающих, дрожжей или нитевидных грибов. Различные бактерии включают *Escherichia* и *Bacillus*. При необходимости можно использовать дрожжи рода *Saccharomyces* или *Pichia*.

#### Фармацевтические композиции

[00106] Предусмотрено, что новую кинурениназу можно вводить системно или местно для ингибирования роста опухолевых клеток и, наиболее предпочтительно, уничтожения раковых клеток у онкологических пациентов с местнораспространенными или метастатическими онкологическими заболеваниями. Их можно вводить внутривенно, интратекально и/или внутрибрюшинно. Их можно вводить одни или в комбинации с антипролиферативными лекарственными препаратами. В одном варианте осуществления их вводят для снижения раковой нагрузки у пациента перед хирургическим вмешательством или другой процедурой. В альтернативном варианте их можно вводить после хирургического вмешательства, чтобы гарантировать, что любые оставшиеся раковые образования (например,

раковые образования, которые не были удалены при хирургическом вмешательстве) не выживут.

[00107] Предполагается, что данное изобретение не ограничено конкретной природой терапевтического препарата. Например, такие композиции могут быть получены в составах вместе с физиологически переносимыми жидкими, гелевыми или твердыми носителями, разбавителями и вспомогательными веществами. Эти терапевтические препараты можно вводить млекопитающим для применения в ветеринарии, например, домашним животным, и клинического применения на людях способом, аналогичным другим терапевтическим агентам. В общем случае дозировка, необходимая для терапевтической эффективности, будет варьироваться в соответствии с типом применения и способом введения, а также конкретными требованиями для отдельных субъектов.

[00108] Такие композиции, как правило, изготавливают в виде жидких растворов или суспензий для инъекций. Подходящими разбавителями и вспомогательными веществами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин и т. п., и их комбинации. Кроме того, при необходимости композиции могут содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, стабилизирующие агенты или рН-буферные агенты.

[00109] В тех случаях, когда предусмотрены клинические применения, может быть необходимо изготавливать фармацевтические композиции, содержащие белки, антитела и лекарственные препараты, в форме, соответствующей предполагаемому применению. В общем случае фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество одной или более кинурениназ или одного или более дополнительных агентов, растворенных или диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе. Выражения «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относятся к молекулярным компонентам и композициям, которые не вызывают нежелательную, аллергическую или другую непредусмотренную реакцию при введении животному, такому как, например, человек. Изготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну кинурениназу, выделенную раскрытым в данном документе способом, или дополнительный активный ингредиент, станет понятным специалистам в данной области техники в контексте данного изобретения, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, включенной в данный документ посредством ссылки. Кроме того, в случае введения животному (например, человеку) должно быть понятно, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, апиrogenности, общей безопасности и чистоты, согласно требованиям управления FDA по биологическим стандартам.

[00110] В контексте данного документа «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, диспергирующие среды, покрытия,

поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие всасывание, соли, консерванты, лекарственные препараты, стабилизаторы лекарственных препаратов, гели, связующие вещества, вспомогательные вещества, разрыхлители, лубриканты, подсластители, ароматизаторы, красители и подобные материалы и их комбинации, как известно специалистам в данной области техники (смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, включенную в данный документ посредством ссылки). За исключением случаев, когда традиционный носитель несовместим с активным ингредиентом, предусмотрено его применение в фармацевтических композициях.

[00111] Определенные варианты осуществления данного изобретения могут включать применение разных типов носителей в зависимости от того, осуществляется ли введение в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и того, является ли необходимой стерильность для пути введения, такого как инъекция. Композиции можно вводить внутривенно, интрадермально, трансдермально, интратекально, внутриартериально, внутрибрюшинно, интраназально, интравагинально, интаректально, внутримышечно, подкожно, мукозально, перорально, местно, локально, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), путем инъекции, путем инфузии, путем непрерывной инфузии, путем локализованной перфузии с прямым промыванием целевых клеток, через катетер, через лаваж, в липидных композициях (например, липосомах) или любыми другими способами или с помощью комбинации вышеперечисленного, как известно специалисту в данной области техники (смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, включенную в данный документ посредством ссылки).

[00112] Модифицированные полипептиды можно вводить в состав композиции в форме свободного основания, нейтральной или солевой формах. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот, например, образуемые со свободными аминогруппами белковой композиции или образуемые с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислоты. Соли, образуемые со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. После составления растворы вводят способом, совместимым с дозированной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводить в ряде дозированных форм, например, изготовленных для парентерального введения, таких как растворы для инъекций или

аэрозоли для доставки в легкие, или изготовленных для проглатывания, таких как капсулы для высвобождения лекарственного препарата и т. п.

[00113] Кроме того, в соответствии с определенными аспектами данного изобретения подходящая для введения композиция может быть предоставлена в фармацевтически приемлемом носителе с инертным разбавителем или без. Носитель должен усваиваться и включает жидкие, полутвердые, т. е. пастообразные, или твердые носители. За исключением случаев, когда традиционные среды, агенты, разбавители или носители вредны для реципиента или для терапевтической эффективности композиции, содержащейся в них, их использование в вводимой композиции для применения при практической реализации способов является целесообразным. Примеры носителей или разбавителей включают жиры, масла, воду, солевые растворы, липиды, липосомы, смолы, связующие вещества, наполнители и т. п. или их комбинации. Композиция также может содержать любые антиоксиданты для замедления окисления одного или более компонентов. Кроме того, предотвращение действия микроорганизмов можно осуществлять с помощью консервантов, таких как различные антибактериальные и противогрибковые агенты, включая, но не ограничиваясь этим, парабены (например, метилпарабены, пропилпарабены), хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал или их комбинации.

[00114] В соответствии с определенными аспектами данного изобретения композицию объединяют с носителем любым удобным и практическим способом, т. е. с помощью раствора, суспензии, эмульгации, примешивания, инкапсуляции, абсорбции и т. п. Такие процедуры являются рутинными для специалистов в данной области техники.

[00115] В конкретном варианте осуществления данного изобретения композицию объединяют или тщательно смешивают с полутвердым или твердым носителем. Смешивание можно проводить любым удобным способом, таким как помол. Также в процессе смешивания можно добавлять стабилизирующие агенты, чтобы защитить композицию от потери терапевтической активности, т. е. денатурации в желудке. Примеры стабилизаторов для применения в композиции включают буферы, аминокислоты, такие как глицин и лизин, углеводы, такие как декстроза, манноза, галактоза, фруктоза, лактоза, сахароза, мальтоза, сорбит, маннит и т. д.

[00116] В дополнительных вариантах осуществления данное изобретение может относиться к применению фармацевтической композиции с липидным носителем, которая содержит кинурениназы, один или более липидов и водный растворитель. В контексте данного документа термин «липид» по определению включает любое из широкого спектра веществ, для которых характерны нерастворимость в воде и возможность экстракции органическим растворителем. Этот широкий класс соединений хорошо известен специалистам в данной области

техники, и в контексте данного документа термин «липид» не ограничен какой-либо конкретной структурой. Примеры включают соединения, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные. Липид может быть природного происхождения или синтетическим (т. е. сконструированным или созданным человеком). При этом обычно липид является биологическим веществом. Биологические липиды хорошо известны в данной области техники и включают, например, нейтральные жиры, фосфолипиды, фосфоглицериды, стероиды, терпены, лизолипиды, гликофинголипиды, гликолипиды, сульфатиды, липиды с связанными с эфирами и сложными эфирами жирными кислотами, полимеризуемые липиды и их комбинации. Конечно, соединения, отличные от специально описанных в данном документе, известные специалисту в данной области техники как липиды, также охвачены композициями и способами.

[00117] Специалисту в данной области техники известен диапазон методик, которые можно использовать для диспергирования композиции в липидном носителе. Например, кинурениназа или ее слитый белок могут быть диспергированы в растворе, содержащем липид, растворены с липидом, эмульгированы с липидом, смешаны с липидом, объединены с липидом, ковалентно связаны с липидом, находиться в виде суспензии в липиде, находиться или образовывать комплекс с мицеллой или липосомой или быть иным образом связанными с липидом или липидной структурой любыми средствами, известными специалистам в данной области техники. Дисперсия может приводить к образованию липосом или нет.

[00118] Фактическое дозированное количество композиции, вводимое животному-пациенту, можно определять по физическим и физиологическим факторам, таким как масса тела, тяжесть патологического состояния, тип подлежащего лечению заболевания, предыдущие или параллельные терапевтические вмешательства, идиопатия пациента, и зависимо от пути введения. В зависимости от дозировки и пути введения число введений предпочтительной дозировки и/или эффективного количества может варьироваться в соответствии с ответом субъекта. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае будет определять концентрацию активного(ых) ингредиента(ов) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для отдельного субъекта.

[00119] В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере около 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может составлять от около 2% до около 75% массы единичной дозы, или от около 25% до около 60%, например, любой диапазон, определяемый этими значениями. Естественно, количество активного(ых) соединения(й) в каждой терапевтически применимой композиции можно готовить так, чтобы получить подходящую дозировку в любой заданной единичной дозе соединения. При изготовлении таких фармацевтических составов специалист в данной области техники должен учитывать

факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические особенности, и, следовательно, может существовать необходимость в ряде дозировок и схем лечения.

[00120] В других неограничивающих примерах доза также может составлять от около 1 микрограмм/кг/массы тела, около 5 микрограмм/кг/массы тела, около 10 микрограмм/кг/массы тела, около 50 микрограмм/кг/массы тела, около 100 микрограмм/кг/массы тела, около 200 микрограмм/кг/массы тела, около 350 микрограмм/кг/массы тела, около 500 микрограмм/кг/массы тела, около 1 миллиграмм/кг/массы тела, около 5 миллиграмм/кг/массы тела, около 10 миллиграмм/кг/массы тела, около 50 миллиграмм/кг/массы тела, около 100 миллиграмм/кг/массы тела, около 200 миллиграмм/кг/массы тела, около 350 миллиграмм/кг/массы тела, около 500 миллиграмм/кг/массы тела до около 1000 миллиграмм/кг/массы тела или более на введение, и любой диапазон, определяемый этими значениями. В неограничивающих примерах диапазона, определяемого перечисленными в данном документе значениями, можно вводить дозу в диапазоне от около 5 миллиграмм/кг/массы тела до около 100 миллиграмм/кг/массы тела, от около 5 микрограмм/кг/массы тела до около 500 миллиграмм/кг/массы тела и т. д., с учетом описанных выше числовых значений.

#### Комбинированное лечение

[00121] В определенных вариантах осуществления композиции и способы по представленным вариантам осуществления включают введение кинурениназы в комбинации со вторым или дополнительным вариантом терапии. Такую терапию можно применять при лечении любого заболевания, которое связано с зависимостью от кинурениназы. Например, заболевание может быть онкологическим.

[00122] Способы и композиции, включая комбинированную терапию, усиливают терапевтический или защитный эффект и/или повышают терапевтический эффект другой противораковой или антигиперпролиферативной терапии. Терапевтические и профилактические способы и композиции могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для достижения необходимого эффекта, такого как уничтожение раковых клеток и/или ингибирование клеточной гиперпролиферации. Этот процесс может включать введение кинурениназы и другого варианта терапии. Второй вариант терапии может иметь или не иметь прямой цитотоксический эффект. Например, второй вариант терапии может представлять собой агент, который повышает регуляцию иммунной системы без оказания прямого цитотоксического эффекта. Ткань, опухоль или клетку можно подвергать воздействию одной или более композиций или одного или более фармакологических составов, содержащих один или более агентов (например, кинурениназу или противораковый агент) или же подвергать ткань, опухоль и/или клетку воздействию двух или более разных композиций или составов, причем одна

композиция содержит 1) кинурениназу, 2) противораковый агент или 3) как кинурениназу, так и противораковый агент. Также предусмотрено, что такую комбинированную терапию можно применять в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, хирургической терапией или иммунотерапией.

[00123] Термины «приведенная в контакт» и «подвергнутая воздействию» при применении к клетке используются в данном документе для описания процесса, посредством которого терапевтическую конструкцию или химиотерапевтический агент или агент для лучевой терапии доставляют в целевую клетку или размещают рядом с целевой клеткой. Например, для обеспечения уничтожения клеток оба агента доставляют в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

[00124] Кинурениназу можно вводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно противоракового лечения. Введения можно осуществлять с интервалами в диапазоне от одновременного введения до минут, суток и недель. В вариантах осуществления, в которых кинурениназу вводят пациенту отдельно от противоракового агента, в общем случае следует убедиться, что между моментами каждого введения не прошел слишком большой период времени, так чтобы два соединения могли оказывать преимущественный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предусмотрена возможность введения пациенту кинурениназы и противораковой терапии в пределах от около 12 до 24 или 72 ч относительно друг друга, конкретнее, в пределах около 6-12 ч относительно друг друга. В некоторых ситуациях может возникать необходимость существенного продления периода времени для лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[00125] В определенных вариантах осуществления курс лечения длится 1-90 суток или более (этот диапазон включает промежуточные сутки). Предусмотрено, что один агент можно вводить на любые сутки от 1 суток до 90 суток (этот диапазон включает промежуточные сутки) или любую их комбинацию, а другой агент вводят на любые другие сутки от 1 суток до 90 суток (этот диапазон включает промежуточные сутки) или любую их комбинацию. В течение одних суток (24-часового периода) можно осуществлять одно или несколько введений агента(ов) пациенту. Кроме того, предусмотрено, что после курса лечения наступает период времени, в течение которого не применяют никакое противораковое лечение. Этот период может длиться 1-7 суток и/или 1-5 недель, и/или 1-12 месяцев (этот диапазон включает промежуточные сутки) в зависимости от состояния пациента, такого как его прогноз, сила, здоровье и т. д. Ожидается, что циклы лечения можно при необходимости повторять.

[00126] Можно применять различные комбинации. В примере ниже кинурениназа представлена как «А», а противораковая терапия представлена как «В»:

A/V/A B/A/B B/V/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B  
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A  
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[00127] При введении пациенту любых соединений или терапии по представленным вариантам осуществления будут соблюдаться общие протоколы для введения таких соединений с учетом токсичности агентов в случае ее наличия. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления есть этап отслеживания токсичности, связанной с комбинированной терапией.

#### Примеры

[00128] Следующие примеры включены, чтобы продемонстрировать предпочтительные варианты осуществления данного изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, раскрытые в нижеприведенных примерах, представляют методики, которые, как обнаружил автор изобретения, хорошо работают при практической реализации изобретения, и, таким образом, могут считаться представляющими предпочтительные способы для его практической реализации. При этом специалистам в данной области техники в свете представленного раскрытия должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах осуществления можно сделать много изменений и при этом получить подобный или аналогичный результат, не отступая от сути и объема изобретения.

Пример 1 - Разработка и изучение характеристик человеческой киназы (h-KYNase)

[00129] Представленные исследования включали конструирование вариантов h-KYNase и разработку вариантов в качестве терапевтических средств для широкого диапазона опухолей. Были сконструированы многочисленные человеческие варианты и определена их каталитическая активность ( $K_{кат}/K_M$ ) в отношении Kyn, сравнимая с киназами бактериального инструмента (Фиг. 1А и Таблица 2, ниже). Варианты были оптимизированы для повышения каталитической активности и для устойчивости к дезактивации в 90% человеческой сыворотке *in vitro* (выражаемой в виде остаточной активности после инкубации в сыворотке в течение определенного времени). Было обнаружено, что сконструированные человеческие варианты имели значительно улучшенную каталитическую активность в человеческой сыворотке *in vitro* (Фиг. 1В и Таблица 2).

[00130] Человеческие варианты, такие как белки (68) и (153), демонстрировали продолжительное разложение Kyn у мышей после одной внутривенной дозы (Фиг. 1С). Для этих исследований самкам мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель, весивших приблизительно 18-20 г, вводили в/в дозу базового раствора (ФСБ, pH 7,4) или 10 мг/кг (68)/(153). Через 6, 24, 48, 72 и 120 ч после введения дозы у мышей



брали кровь в терминальный момент времени (n=4 мыши/момент времени), а образцы плазмы незамедлительно гасили кислотой, содержащей раствор внутреннего стандарта (ВС), и обрабатывали для ЖХ/МС анализа кинуренина.

Таблица 2: Каталитическая активность и сывороточная стабильность для выбранных вариантов фермента

Белок	Кофактор	Кратность увеличения относительн о дикого типа	$k_{кат}$ ( $c^{-1}$ )	$K_M$ (мМ)	$k_{кат}/K_M$ ( $M^{-1} c^{-1}$ )	Стабильность в 90% сыворотке			
						Средний % стабильности			
						24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
2	PLP	27 ± 9							
3	PLP	28	0,86	0,31	2800				
4	PLP	19 ± 10							
5	PLP	15	0,85	0,57	1500				
6	PLP	16 ± 6							
7	PLP	12	0,71	0,57	1246				
8	PLP	15 ± 5							
9	PLP	10	0,71	0,69	1023				
10	PLP	58 ± 12							
11	PLP	176	0,6	0,034	17647				
12	PLP	554	1,21	0,022	55367				
13	PLP	698	1,5	0,021	69775				
14	PLP	24	1	0,43	2350				
15	PLP	20	1,22	0,67	1967				
16	PLP	29	1,4	0,48	2920				

Белок	Кофактор	Кратность увеличения				Средний % стабильности			
		относительн о дикого типа	$k_{кат}$ ( $c^{-1}$ )	$K_M$ (мМ)	$k_{кат}/K_M$ ( $M^{-1} c^{-1}$ )				
						24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
17	PLP	23	1,68	0,75	2250				
18	PLP	20	1,38	0,7	2000				
19	PLP	587	0,55	0,0093	58700				
20	PLP	388	0,993	0,026	38789				
21	PLP	424	0,94	0,022	42398				
22	PLP	342	1,06	0,031	34226				
23	PLP	405	0,85	0,021	40524				
24	PLP	379	0,87	0,023	37913				
25	PLP	336	0,7	0,021	33623				
26	PLP	389	0,65	0,017	38916				
27	PLP	368	0,76	0,021	36829				
28	PLP	305	1,109	0,036	30467				
29	PLP	526	1,32	0,0251	52590				
30	PLP	342	1,06	0,031	34226				
31	PLP	277	0,698	0,0252	27698				
32	PLP	550	0,852	0,0155	54968				

Белок	Кофактор	Кратность увеличения				$k_{кат}/K_M (M^{-1} c^{-1})$	Стабильность в 90% сыворотке			
		относительн о дикого типа	$k_{кат} (c^{-1})$	$K_M (mM)$	Средний % стабильности					
					24 ч	48 ч	72 ч	120 ч		
33	PLP	580	1,3	0,022	57979					
34	PLP	366	1,011	0,0276	36630					
35	PLP	219	0,874	0,0399	21904					
36	PLP	270	0,645	0,0239	26987					
37	PLP	536	0,638	0,0119	53613					
38	PLP	488	0,84	0,0173	48790					
39	PLP	90	0,53	0,06	9020					
40	PLP	24	0,22	0,09	2400					
41	PLP	2,1	0,50	1,90	260					
42	PLP	4	0,250	0,640	400					
43	PLP	4	0,30	0,70	428					
44	PLP	3	0,15	0,48	313					
45	PLP	3	0,270	0,950	280					
46	PLP	3	0,250	1,000	250					
47	PLP	3	0,250	0,730	335					
48	PLP	3	0,320	0,950	340					

Белок	Кофактор	Кратность увеличения				$k_{кат}/K_M (M^{-1} c^{-1})$	Стабильность в 90% сыворотке			
		относительн о дикого типа	$k_{кат} (c^{-1})$	$K_M (mM)$	Средний % стабильности					
					24 ч		48 ч	72 ч	120 ч	
49	PLP	3	0,27	0,8	340					
50	PLP	3	0,23	0,7	320					
51	PLP									
52	PLP									
53	PLP	591	0,975	0,017	59075					
54	PLP	457	1,737	0,038	45706					
55	PLP	512	1,024	0,020	51222					
56	PLP	269	1,042	0,039	26861					
57	PLP	363	0,970	0,027	36330					
58	PLP	411	1,192	0,029	41111					
59	PLP	635	1,098	0,017	63492					
60	PLP	788	1,048	0,013	78780					
61	PLP	368	0,805	0,022	36770					
62	PLP	359	0,507	0,014	35933					
63	PLP	415	0,954	0,023	41464					
64	PLP	502	0,457	0,009	50183					





Белок	Кофактор	Кратность увеличения				$k_{кат}/K_M (M^{-1} c^{-1})$	Стабильность в 90% сыворотке			
		относительн о дикого типа	$k_{кат} (c^{-1})$	$K_M (mM)$	Средний % стабильности					
						24 ч	48 ч	72 ч	120 ч	
96	PLP	137	1,5	0,1	13700					
97	PLP	67	0,67	0,099	6729					
98	PLP		0,58	0,118	4897					
99	PLP		0,73	0,089	8266					
100	PLP		0,73	0,046	16148					
101	PLP		1,02	0,055	18569					
102	PLP		0,97	0,087	11141					
103	PLP		0,92	0,041	22282					
104	PLP		0,96	0,049	19537					
105	PLP		1,01	0,053	18825					
106	PLP	145	0,93	0,065	14470					
107	PLP		0,71	0,037	19165					
108	PLP		0,47	0,119	3981					
109	PLP		0,81	0,029	27722					
110	PLP		0,99	0,039	25306					
111	PLP	135,1	1,18	0,09	13511					



Белок	Кофактор	Кратность увеличения				К <sub>кат</sub> /K <sub>М</sub> (M <sup>-1</sup> c <sup>-1</sup> )	Стабильность в 90% сыворотке			
		относительн о дикого типа	k <sub>кат</sub> (c <sup>-1</sup> )	K <sub>М</sub> (мМ)	Средний % стабильности		24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
112	PLP	140,2	0,76	0,05	14016					
113	PLP	248	1,44	0,06	24798	9		3		
114	PLP	271,7	0,89	0,032	27169					
115	PLP	68,8	0,67	0,1	6883					
116	PLP	173,3	1	0,06	17326					
117	PLP	132,3	0,99	0,08	13228					
118	PLP	193,3	1,11	0,06	19332	16		4		
119	PLP	142	1,31	0,092	14205					
120	PLP	108	0,81	0,075	10814					
121	PLP	197	0,42	0,021	19719					
122	PLP	348	0,82	0,024	34797					
123	PLP	81	1,03	0,127	8106					
124	PLP	244	0,66	0,027	24395					
125	PLP	301	1,31	0,044	30103					
126	PLP	220	0,98	0,045	21971					
127	PLP	315	1,26	0,040	31455					

Стабильность в  
90% сыворотке

Средний % стабильности

Белок	Кофактор	Кратность увеличения				Средний % стабильности			
		относительн о дикого типа	$k_{кат}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_M$ (мМ)	$k_{кат}/K_M$ (М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
128	PLP	267	1,07	0,040	26684				
129	PLP	193	0,86	0,045	19309				
130	PLP	169	0,58	0,034	16898				
131	PLP	309	1,10	0,036	30903				
132	PLP	192	1,15	0,060	19201				
133	PLP	169	1,07	0,063	16870				
134	PLP	150	0,82	0,054	15035				
135	PLP	75	0,82	0,109	7487				
136	PLP	350	1,235	0,035	35286				
137	PLP	210	0,943	0,0449	21002	4	2	1	
138	PLP	314	1,414	0,045	31422	45 ± 8	27 ± 7	22 ± 4	
139	PLP	243	1,418	0,0583	24322				
140	PLP	181	0,91	0,05	18068				
141	PLP	160	0,97	0,06	16020				
142	PLP	165	1,10	0,07	16467,07	33	18	2	
143	PLP	159	1,07	0,07	15952,38				

Белок	Кофактор	Кратность увеличения				$k_{кат}/K_M (M^{-1} c^{-1})$	Стабильность в 90% сыворотке			
		относительн о дикого типа	$k_{кат} (c^{-1})$	$K_M (mM)$	Средний % стабильности					
						24 ч	48 ч	72 ч	120 ч	
144	PLP	139	0,08	0,05	1400					
145	PLP	88	0,93	0,11	8837,76					
146	PLP	106	0,74	0,07	10584					
147	PLP	127	1,09	0,09	12740					
148	PLP	144	1,06	0,07	14403,79					
149	PLP	130	1,03	0,08	13039,09					
150	PLP	130	1,03	0,05	18889					
151	PLP	130	1,08	0,08	13626					
152	PLP	92	0,692	0,0756	9153	62	42	32		
153	PLP	337	1,01	0,03	33667	72 ± 8	68 ± 10	56 ± 8		
154	PLP	235	0,598	0,0255	23451	69		53		
155	PLP	236	1,21	0,051	23633	26	5	0		
156	PLP	353	1,15	0,033	35323	35	3	0		
157	PLP	423	1,26	0,030	42282	76	59	38		
158	PLP	309	1,14	0,037	30894	66	48	33		

						Стабильность в 90% сыворотке	Средний % стабильности			
Белок	Кофактор	Кратность увеличения				$k_{кат}/K_M (M^{-1} c^{-1})$	24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
		относительн о дикого типа	$k_{кат} (c^{-1})$	$K_M (mM)$						
159	PLP	296	1,39	0,047	29638	55	35	22		
160	PLP	243	1,98	0,081	24335	41	16	3		
161	PLP	251	1,05	0,042	25120	71	66	55		
162	PLP	248	1,12	0,045	24800	63	55	41		
163	PLP	173	0,99	0,058	17290	77	66	45		
164	PLP	330	0,34	0,010	33010	16	5	0		
165	PLP	354	1,63	0,046	35430	87	51	42		
166	PLP	347	1,06	0,031	34710	76	53	43		
167	PLP	316	1,04	0,033	31650	69	51	45		
168	PLP	330	0,78	0,024	33000	97 ± 1	88 ± 11	82 ± 1		
169	PLP	99	0,47	0,047	9900	73	75	56		
170	PLP	177	0,70	0,040	17663,0	76	65	60		
171	PLP	275	0,71	0,026	27517,0	65	63	57		
172	PLP	148	0,53	0,036	14750,0	79	79	65		
173	PLP	209	0,99	0,047	20930,0	83	64	72		

Белок	Кофактор	Кратность увеличения относительн о дикого типа	$k_{кат}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_M$ (мМ)	$k_{кат}/K_M$ (М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	Стабильность в 90% сыворотке			
						Средний % стабильности			
						24 ч	48 ч	72 ч	120 ч
174	PLP	274	0,58	0,021	27371,0	68	76	47	
175	PLP	146	0,56	0,038	14605,0	69	73	65	
176	PLP	206	0,60	0,029	20552,0	64	67	44	
177	PLP	167	0,63	0,038	16684,0	65	45	43	
178	PLP	160	1,40	0,090	15500				
179	PLP	14	1,10	0,80	1400				
180	PLP	20	1,40	0,70	2000				
181	PLP	115	0,723	0,063	11476,2	70			22
182	PLP	171	0,685	0,040	17125,0	52			25
183	PLP	171	0,684	0,040	17100,0	91			45
184	PLP	346	1,440	0,042	34615,4	63			3
185	PLP	137	0,959	0,070	13700,0	0			0

### Пример 2 - Эффективность и противоопухолевая память HsKYN

[00131] После этого исследовали *in vivo* эффективность варианта HsKYN в мышинной модели СТ26, а также моделях В16-ИДО. 6-8-недельным самкам мышей линии BALB/c подкожно имплантировали 500000 клеток СТ26 в 100 мкл ФСБ в нижнюю часть правого бока. Введение доз начинали на 4 сутки после инокуляции клеток. Белок (68) вводили подкожно в дозе 10 мг/кг раз в 6 суток в количестве 3 доз; эпикадостат вводили перорально в дозе 300 мг/кг раз в сутки (5 суток введения, 2 суток перерыва); анти-PD-1 вводили внутривентриально в дозе 10 мг/кг раз в 3 суток в количестве 5 доз. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью цифрового штангенциркуля, а объем опухолей рассчитывали по формуле:  $\text{Объем} = (L \times W \times T) \times \pi/6$ . Животных умерщвляли, когда опухоли достигали  $> 2000 \text{ мм}^3$  (Фиг. 2А). Через сто суток после появления последнего демонстрирующего полный ответ (ПО) животного из (А), наивных мышей линии BALB/c и животных ПО повторно стимулировали СТ26, имплантируемыми подкожно в нижнюю часть правого бока. Объем опухолей измеряли, как описано выше, а результаты проиллюстрированы на Фиг. 2В.

### Пример 3 - Опухолевое иммунопрофилирование HsKYN

[00132] Иммунопрофилирование (68) проводили у несущих опухоль СТ26 мышей. 6-8-недельным самкам мышей линии BALB/c подкожно имплантировали 500000 клеток СТ26 в 100 мкл ФСБ в нижнюю часть правого бока. Введение доз начинали на 4 сутки после инокуляции клеток. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью цифрового штангенциркуля, а объем опухолей рассчитывали по формуле:  $\text{Объем} = (L \times W \times T) \times \pi/6$ . Животных умерщвляли через 24 часа введения последней дозы и собирали опухоли для последующего анализа. Белок (68) вводили подкожно в дозе 10 мг/кг раз в 6 суток в количестве 2 доз; анти-PD-1 вводили внутривентриально в дозе 10 мг/кг раз в 3 суток в количестве 3 доз. РНК экстрагировали, используя набор Qiagen RNeasy, и использовали 100 нг РНК для анализа Nanostring с применением панели для иммунопрофилирования PanCancer (Фиг. 3А). Для исследований, проиллюстрированных на Фиг. 3В, (68) вводили подкожно в дозе 10 мг/кг раз в 6 суток в количестве 2 доз. Опухоли расщепляли с помощью набора для разделения опухолей от Miltenyi. Суспензии из одиночных клеток окрашивали мечеными антителами и анализировали, используя Fortessa: CD8 (CD45+ CD3+ CD8+ CD4-); Treg (CD45+ CD3+ CD4+ CD8- FoxP3+ CD25+); макрофаги M1 (CD45+ CD11b+ F4/80+ MHCII+ CD206-); макрофаги M2 (CD45+ CD11b+ F4/80+ MHCII+ CD206+).

### Пример 4 - ФК и ФД профили основного варианта HsKYN у крыс и ОЧП

[00133] Самцам крыс линии Спрег - Доули (200-300 г) в/в вводили одну дозу или 3 недельные дозы по 10 мг/кг (153) путем медленной инъекции через хвостовую вену. Кровь брали за 24 ч до введения дозы (-24 ч), через 6, 24, 48, 72 или 120 ч после 1-ой, 2-ой или 3-ей дозы (n=4 крысы/момент времени). Образцы плазмы

обрабатывали, как описано на Фиг. 1С, и анализировали уровни кинуренина методом ЖХ/МС (Фиг. 4А). После этого одному самцу и одной самке яванского макака (в возрасте  $\geq 2$  года) в/в вводили одну дозу в 10 мг/кг (153) путем медленной инъекции через подкожную вену. Кровь брали до введения дозы (0 ч), через 0,25, 6, 24, 48, 72, 120, 168, 240 и 336 ч после введения дозы. Образцы плазмы разделяли на две части: одну часть обрабатывали, как описано на Фиг. 1С для ЖХ/МС анализа кинуренина (Фиг. 4В); для другой части проводили ИФА анализ ПЭГилированного белка (анти-ПЭГ антитело (Abscam № ab51257) для захвата и биотинилированное анти-ПЭГ антитело (Abscam № ab53449) обнаружения). Данные зависимости плазменной концентрации от времени анализировали с помощью некомпартментных подходов, используя программное обеспечение WinNonlin, и рассчитывали фармакокинетические параметры с  $C_0$ ,  $C_{\text{макс}}$ ,  $T_{1/2}$ , ППК<sub>0-посл</sub>, ППК<sub>0-беск</sub>.

[00134] Таким образом, представленные исследования показали, что разложение кинуренина киназой широко применимо к опухолям с экспрессией как ИДО, так и ТДО. Конструирование белка HsKYN позволило достичь более чем 500-кратного повышения каталитической активности и значительно улучшило каталитическую стабильность, что привело к сильному и продолжительному снижению уровней Kyn *in vivo*. Вариант HsKYN продемонстрировал превосходную эффективность как единственный агент и в комбинации с PD1 по сравнению с эпикадостатом, а также устойчивую противоопухолевую память. Повышенная экспрессия связанного с IFNg T-клеточного воспалительного сигнатурного гена и отношение макрофагов M1/M2, вероятно, являются механизмами, которые лежат в основе опосредованной HsKYN +/- PD1 противоопухолевой эффективности. И наконец, благоприятные ФК/ФД профили у доклинических токсикологических видов свидетельствуют в пользу дальнейшей клинической разработки основного варианта HsKYN.

\* \* \*

[00135] Все раскрытые и заявленные в данном документе способы можно реализовать и осуществлять без проведения ненужных экспериментов в свете представленного раскрытия. Хотя композиции и способы по этому изобретению были описаны в контексте предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что можно применять вариации в отношении способов и этапов или последовательностей этапов способа, описанных в данном документе, не отступая от концепции, сущности и объема изобретения. В частности, будет очевидно, что определенными агентами, которые являются химически и физиологически родственными, можно замещать агенты, описанные в данном документе, с достижением таких же самых или сходных результатов. Подразумевается, что все такие аналогичные заместители и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в

рамках сущности, объема и концепции изобретения, определяемых прилагаемой формулой изобретения.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Нижеприведенные ссылки, в той степени, в которой они описывают типовые процедурные или другие подробности, дополняющие приведенные в данном документе, явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Ahmed *et al.*, HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clinical Cancer Research*, 16(2):474-485, 2010.

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Chen and Guillemin, Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 2:1-19, 2009.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cole and Gaucher, Exploiting models of molecular evolution to efficiently direct protein engineering. *J. Mol. Evol.*, 72:193, 2011.

Curran *et al.*, PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:4275-4280, 2010.

Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

de Jong *et al.*, Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21(7):1320-1327, 2011.

Della Chiesa *et al.*, The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of Nkp46-and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 108(13):4118-4125, 2006.

Godin-Ethier *et al.*, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17(22):6985-6991, 2011.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Harkki *et al.*, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.

Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Holmgaard *et al.*, Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:1389-1402, 2013.

Hoover and Lubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 30(10):e43-e43, 2002.

Hopwood *et al.*, In: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual,

The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

Ito *et al.*, *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.

Kaper *et al.*, Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. *PLoS Biology*, 5(10):e257, 2007.

Lipowska-Bhalla *et al.*, Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61(7):953-962, 2012.

Lob *et al.*, Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*, 9(6):445-452, 2009.

Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597-601, 1975.

Mandi and Vecsei, The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*, 119(2):197-209, 2012.

Maniatis, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

Mellor *et al.*, *Gene*, 24:1-14, 1983.

Mezrich *et al.*, An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 185(6):3190-3198, 2010.

Opitz *et al.*, The Indoleamine-2, 3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS One*, 6(5):e19823, 2011.

Opitz *et al.*, An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368):197-203, 2011.

Penttila *et al.*, *Gene*, 61:155-164, 1987.

Pilotte *et al.*, Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7):2497-2502, 2012.

Prendergast, Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*, 478(7368):192-194, 2011.

Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.

Rutella *et al.*, Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 9(2):151-177, 2009.

Schellenberger *et al.*, *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.

Shin *et al.*, Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(30):12391-12396, 2013.

Sibakov *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.

Song *et al.*, L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *International Immunopharmacology*, 11(8):932-938, 2011.

Stone *et al.*, Replacing Mn<sup>2+</sup> with Co<sup>2+</sup> in human arginase I enhances cytotoxicity

toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. *ACS Chemical Biology*, 5:333-342, 2010.

Voigt *et al.*, Protein building blocks preserved by recombination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9:553, 2002.

Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.

Wawrzynczak and Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Yao *et al.*, Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*, 7(9):2608-2614, 2011.

Yoshikawa *et al.*, Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol*, 84(4):304-309, 2010.

Далее данное раскрытие дополнительно описано в следующих пронумерованных вариантах осуществления:

Вариант осуществления 1. Выделенный модифицированный фермент кинурениназы человека, причем указанный модифицированный фермент имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична с ферментом кинурениназы человека по SEQ ID NO: 1 и содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L8P, K38E, Y47L, I48F, K50Q, I51M, S60N, K64N, D65G, E66K, N67D, N67P, D67S, A68F, A68T, A68V, F71L, F71M, L72N, K84E, E88N, E89K, E89S, E90Q, D92E, K93N, K93T, A95H, A95Q, K96N, I97H, I97L, I97V, A98G, A99G, A99I, A99R, A99S, A99T, A99V, Y100N, Y100S, Y100T, G101A, H102W, E103F, E103H, E103N, E103Q, E103R, E103V, E103W, V104D, V104E, V104F, V104H, V104K, V104L, V104R, G105A, G105H, G105S, G105T, E106D, K106D, K106E, K106H, K106N, R107P, R107S, P108R, I110A, I110F, I110L, I110M, I110T, T111D, T111H, T111N, T111R, G112A, G112C, G112D, G112K, G112L, G112M, G112Q, G112R, G112S, G112T, G112Y, N127K, I131V, A132V, L133V, A136T, L137T, T138S, N140D, H142Q, Q14R, Y156H, K163T, D168E, H169R, Q175L, I183F, I183L, I183P, I183S, E184A, E184D, E184R, E184T, E184V, E185T, M187L, M189I, K191A, K191G, K191H, K191M, K191N, K191R, K191S, K191T, K191W, E197A, E197D, E197F, E197K, E197M, E197Q, E197S, E197T, E197V, I201C, I201E, I201F, I201H, I201L, I201S, I201T, I201V, H203K, L219M, L219W, F220L, V223I, F225Y, H230F, H230L, H230Y, N232S, Y246F, F249W, D250E, S274A, S274C, S274G, S274N, S274T, L278M, A280G, A280S, A280T, G281S, A282M, A282P, G284N, I285L, V303L, V303S, F306W, F306Y, S311N, K315E, D317E, D317K, I331C, I331L, I331N, I331S, I331T, I331V, N333T, P334N, P335T, L337T, L338A, L338Q, S341I, K373E, K373N, N375A, N375H, Y376C, Y376F, Y376L, K378G, K378P, K378Q, K378R, K380G, K380S, A382G, A382R, A382T, T383S, K384G, K384N, P386K, P386S, V387L, N389E, I405L, F407Y, S408D, S408N, N411R, D413S, D413V, Q416T, E419A, E419L,

K420E, R421N, V424I, K427M, N429E, G432A и A436T.

Вариант осуществления 2. Фермент по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности любого из полипептидов из Таблицы 1.

Вариант осуществления 3. Фермент по варианту осуществления 1 или 2, содержащий замену A282, F306 и/или F249.

Вариант осуществления 4. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-3, содержащий замену F306W.

Вариант осуществления 5. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-4, содержащий замену L72N.

Вариант осуществления 6. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-5, содержащий замену H102W и/или N333T.

Вариант осуществления 7. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-6, содержащий замену в A99.

Вариант осуществления 8. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-7, содержащий замену в G112.

Вариант осуществления 9. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-8, содержащий замену в E103.

Вариант осуществления 10. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-9, содержащий замену в V104.

Вариант осуществления 11. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-10, содержащий замену в S408.

Вариант осуществления 12. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-11, содержащий замену I183P.

Вариант осуществления 13. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-12, содержащий замену R107P.

Вариант осуществления 14. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-13, содержащий замену A436T.

Вариант осуществления 15. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-14, содержащий по меньшей мере одну замену, выбранную из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T.

Вариант осуществления 16. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-15, содержащий по меньшей мере две, три, четыре или пять замен, выбранных из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T.

Вариант осуществления 17. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-16, содержащий замены L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T.

Вариант осуществления 18. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающийся тем, что фермент имеет каталитическую активность в отношении KYN ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) по меньшей мере  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Вариант осуществления 19. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-18, отличающийся тем, что фермент имеет каталитическую активность в отношении кинуренина (KYN) ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) от около  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $10000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $20000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; или от  $25000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $35000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Вариант осуществления 20. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-19, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 21. Фермент по варианту осуществления 20, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 22. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-19, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 23. Фермент по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 24. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-23, дополнительно содержащий гетерологичный пептидный сегмент.

Вариант осуществления 25. Фермент по любому из вариантов осуществления 1-24, отличающийся тем, что фермент сопряжен с полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Вариант осуществления 26. Фермент по варианту осуществления 25, отличающийся тем, что фермент сопряжен с ПЭГ посредством одного или более остатков Lys или Cys.

Вариант осуществления 27. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент по любому из вариантов осуществления 1-26.

Вариант осуществления 28. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 27, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота является кодон-оптимизированной для экспрессии в бактериях, грибах, насекомых или млекопитающих.

Вариант осуществления 29. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 27 или 28.

Вариант осуществления 30. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 27 или 28 или экспрессионный вектор по варианту осуществления 29.

Вариант осуществления 31. Клетка-хозяин по варианту осуществления 30, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии, клетку гриба, клетку насекомого или клетку млекопитающего.

Вариант осуществления 32. Клетка-хозяин по варианту осуществления 31, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии.

Вариант осуществления 33. Клетка-хозяин по варианту осуществления 31, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, необязательно, при этом клетка млекопитающего представляет собой иммунную эффекторную клетку.

Вариант осуществления 34. Клетка-хозяин по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что иммунная эффекторная клетка представляет собой НК-клетку или Т-клетку.

Вариант осуществления 35. Фармацевтический состав, содержащий фермент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26 в фармацевтически приемлемом носителе.

Вариант осуществления 36. Способ лечения субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту эффективного количества фермента по любому из вариантов осуществления 1-26 или состава по варианту осуществления 35.

Вариант осуществления 37. Композиция, содержащая эффективное количество фермента по любому из вариантов осуществления 1-26 или состав по варианту осуществления 35, для применения в лечении субъекта, имеющего опухоль.

Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 36 или композиция по варианту осуществления 37, отличающиеся тем, что субъект был идентифицирован как имеющий опухоль с экспрессией ИДО1, ИДО2 или ТДО.

Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 36 или 38 или композиция по варианту осуществления 37 или 38, отличающиеся тем, что опухоль представляет собой солидную опухоль.

Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 36 или 38 или композиция по варианту осуществления 37 или 38, отличающиеся тем, что опухоль представляет собой гематологическую опухоль.

Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 36 и 38-40 или композиция по любому из вариантов осуществления 37-40, отличающиеся тем, что субъект является пациентом-человеком.

Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 36 и 38-41 или композиция по любому из вариантов осуществления 37-41, отличающиеся тем, что фермент или состав вводят интратуморально, внутривенно, интрадермально, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутрочерепно, внутрисуставно, внутривоскреснично, внутривисцерально, эндотрахеально, интраокулярно, интраназально, интравитреально, интравагинально, интаректально, внутримышечно, подкожно, субконъюнктивально, внутрипузырно, мукозально, интраперикардially, внутрипуповинно, перорально, путем ингаляции, путем инъекции, путем инфузии, путем непрерывной инфузии, путем

локализованной перфузии с прямым промыванием целевых клеток, через катетер или через лаваж.

Вариант осуществления 43. Способ по любому из вариантов осуществления 36 и 38-42, дополнительно включающий введение по меньшей мере второй противораковой терапии.

Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что вторая противораковая терапия представляет собой лучевую терапию, хирургическую терапию, иммунотерапию или второе противораковое соединение.

Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что второе противораковое соединение представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек.

Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 44 или 45, отличающийся тем, что второе противораковое соединение представляет собой антитело.

Вариант осуществления 47. Способ по любому из вариантов осуществления 44-46, отличающийся тем, что второе противораковое соединение включает анти-PD1, анти-CTLA-4 или анти-PD-L1 антитело.

Вариант осуществления 48. Способ по любому из вариантов осуществления 44-47, отличающийся тем, что второе противораковое соединение представляет собой конъюгат лекарственный препарат - антитело.

Вариант осуществления 49. Способ по любому из вариантов осуществления 44-48, отличающийся тем, что иммунотерапия включает введение иммунных эффекторных клеток или иммуногенной композиции.

Вариант осуществления 50. Способ по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что иммуногенная композиция содержит антигены раковых клеток.

Вариант осуществления 51. Способ по варианту осуществления 49 или 50, отличающийся тем, что иммунные эффекторные клетки включают NK-клетки или Т-клетки.

Вариант осуществления 52. Способ по любому из вариантов осуществления 49-51, отличающийся тем, что иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки CAR.

Вариант осуществления 53. Трансгенная Т-клетка, содержащая экспрессируемый фермент кинурениназы в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26.

Вариант осуществления 54. Клетка по варианту осуществления 53, дополнительно содержащая экспрессируемый химерный антигенный Т-клеточный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

Вариант осуществления 55. Клетка по варианту осуществления 53 или 54,

отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку человека.

Вариант осуществления 56. Клетка по варианту осуществления 54 или 55, отличающаяся тем, что ДНК, кодирующая CAR и кинурениназу, интегрирована в геном клетки.

Вариант осуществления 57. Клетка по любому из вариантов осуществления 54-56, отличающаяся тем, что CAR нацелен на антиген раковых клеток.

Вариант осуществления 58. Клетка по варианту осуществления 57, отличающаяся тем, что антиген раковых клеток представляет собой HER2, CD19, CD20 или GD2.

Вариант осуществления 59. Способ обеспечения Т-клеточного ответа у субъекта-человека, имеющего опухоль, включающий введение субъекту эффективного количества трансгенных клеток в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-58.

Вариант осуществления 60. Композиция, содержащая эффективное количество трансгенных клеток в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-58, для применения в лечении субъекта, имеющего опухоль.

Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 59 или композиция по варианту осуществления 60, отличающиеся тем, что трансгенные клетки являются аутологичными.

Вариант осуществления 62. Способ по варианту осуществления 59 или композиция по варианту осуществления 60, отличающиеся тем, что трансгенные клетки являются гетерологичными.

Вариант осуществления 63. Применение фермента кинурениназы в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-26, нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 27 или 28 или экспрессионного вектора в соответствии с вариантом осуществления 29 в производстве лекарственного средства для лечения опухоли.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный модифицированный фермент кинурениназы человека, причем указанный модифицированный фермент имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична с ферментом кинурениназы человека по SEQ ID NO: 1 и содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L8P, K38E, Y47L, I48F, K50Q, I51M, S60N, K64N, D65G, E66K, N67D, N67P, D67S, A68F, A68T, A68V, F71L, F71M, L72N, K84E, E88N, E89K, E89S, E90Q, D92E, K93N, K93T, A95H, A95Q, K96N, I97H, I97L, I97V, A98G, A99G, A99I, A99R, A99S, A99T, A99V, Y100N, Y100S, Y100T, G101A, H102W, E103F, E103H, E103N, E103Q, E103R, E103V, E103W, V104D, V104E, V104F, V104H, V104K, V104L, V104R, G105A, G105H, G105S, G105T, E106D, K106D, K106E, K106H, K106N, R107P, R107S, P108R, I110A, I110F, I110L, I110M, I110T, T111D, T111H, T111N, T111R, G112A, G112C, G112D, G112K, G112L, G112M, G112Q, G112R, G112S, G112T, G112Y, N127K, I131V, A132V, L133V, A136T, L137T, T138S, N140D, H142Q, Q14R, Y156H, K163T, D168E, H169R, Q175L, I183F, I183L, I183P, I183S, E184A, E184D, E184R, E184T, E184V, E185T, M187L, M189I, K191A, K191G, K191H, K191M, K191N, K191R, K191S, K191T, K191W, E197A, E197D, E197F, E197K, E197M, E197Q, E197S, E197T, E197V, I201C, I201E, I201F, I201H, I201L, I201S, I201T, I201V, H203K, L219M, L219W, F220L, V223I, F225Y, H230F, H230L, H230Y, N232S, Y246F, F249W, D250E, S274A, S274C, S274G, S274N, S274T, L278M, A280G, A280S, A280T, G281S, A282M, A282P, G284N, I285L, V303L, V303S, F306W, F306Y, S311N, K315E, D317E, D317K, I331C, I331L, I331N, I331S, I331T, I331V, N333T, P334N, P335T, L337T, L338A, L338Q, S341I, K373E, K373N, N375A, N375H, Y376C, Y376F, Y376L, K378G, K378P, K378Q, K378R, K380G, K380S, A382G, A382R, A382T, T383S, K384G, K384N, P386K, P386S, V387L, N389E, I405L, F407Y, S408D, S408N, N411R, D413S, D413V, Q416T, E419A, E419L, K420E, R421N, V424I, K427M, N429E, G432A и A436T.

2. Фермент по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности любого из полипептидов из Таблицы 1.

3. Фермент по п. 1, содержащий:

- (a) замену в A282, F306 или F249;
- (b) замену F306W;
- (c) замену L72N;
- (d) замены H102W и N333T;
- (e) замену в A99;
- (f) замену в G112;
- (g) замену в E103;
- (h) замену в V104;
- (i) замену в S408;

- (j) замену I183P;
- (k) замену R107P; и/или
- (l) замену A436T.

4. Фермент по п. 1, содержащий по меньшей мере одну замену, выбранную из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T, необязательно при этом фермент содержит по меньшей мере две, три, четыре или пять замен, выбранных из L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T.

5. Фермент по п. 4, содержащий замены L72N, H102W, A282P, F306W, I331S и N333T.

6. Фермент по п. 5, отличающийся тем, что фермент имеет каталитическую активность в отношении кинуренина (KYN) ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) по меньшей мере около  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , необязательно при этом фермент имеет каталитическую активность в отношении KYN от около  $8000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $10000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; от  $20000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $40000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; или от  $25000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $35000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

7. Фермент по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, необязательно, при этом аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

8. Фермент по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий гетерологичный пептидный сегмент.

9. Фермент по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что фермент сопряжен с полиэтиленгликолем (ПЭГ), необязательно при этом фермент сопряжен с ПЭГ в одном или более остатках Lys или Cys.

10. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую фермент по любому из пп. 1-8, необязательно при этом нуклеиновая кислота является кодон-оптимизированной для экспрессии в бактериях, грибах, насекомых или млекопитающих.

11. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10.

12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 10 или экспрессионный вектор по п. 11, необязательно при этом клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии, клетку гриба, клетку насекомого или клетку млекопитающего, необязательно при этом клетка млекопитающего представляет собой иммунную эффекторную клетку млекопитающего, необязательно при этом иммунная эффекторная клетка млекопитающего представляет собой НК-клетку или Т-клетку.

13. Фармацевтический состав, содержащий фермент по любому из пп. 1-9 в фармацевтически приемлемом носителе.

14. Способ лечения субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту эффективного количества фермента по любому из пп. 1-9 или состава по п.

13.

15. Композиция, содержащая эффективное количество фермента по любому из пп. 1-9 или состав по п. 13, для применения в лечении субъекта, имеющего опухоль.

16. Способ по п. 14 или композиция по п. 15, отличающиеся тем, что субъект был идентифицирован как имеющий опухоль с экспрессией ИДО1, ИДО2 или ТДО, необязательно, при этом:

(a) опухоль представляет собой солидную опухоль или гематологическую опухоль;

(b) субъект является пациентом-человеком;

(c) фермент или состав вводят интратуморально, внутривенно, интрадермально, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно, внутрисуставно, внутрипростатически, внутриплеврально, эндотрахеально, интраокулярно, интраназально, интравитреально, интравагинально, интаректально, внутримышечно, подкожно, субконъюнктивально, внутрипузырно, мукозально, интраперикардially, внутрипуповинно, перорально, путем ингаляции, путем инъекции, путем инфузии, путем непрерывной инфузии, путем локализованной перфузии с прямым промыванием целевых клеток, через катетер или через лаваж;

(d) фермент или состав вводят с по меньшей мере второй противораковой терапией, необязательно при этом вторая противораковая терапия представляет собой лучевую терапию, хирургическую терапию, иммунотерапию или второе противораковое соединение, необязательно при этом:

(i) второе противораковое соединение представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, необязательно при этом ингибитор иммунных контрольных точек включает антитело или конъюгат антитело - лекарственный препарат, необязательно при этом антитело представляет собой анти-PD1, анти-CTLA-4 или анти-PD-L1 антитело; и/или

(ii) иммунотерапия включает введение иммунных эффекторных клеток или иммуногенной композиции, необязательно при этом иммуногенная композиция содержит антигены раковых клеток и/или иммунные эффекторные клетки включают НК-клетки, Т-клетки или CAR Т-клетки.

17. Трансгенная Т-клетка, содержащая экспрессируемый фермент кинурениназы по любому из пп. 1-8, необязательно при этом:

(a) трансгенная Т-клетка дополнительно содержит экспрессируемый химерный антигенный Т-клеточный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR);

(b) трансгенная Т-клетка представляет собой трансгенную Т-клетку человека;

(c) ДНК, кодирующая CAR и кинурениназу, интегрирована в геном клетки; и/или

(d) CAR нацелен на антиген раковых клеток, необязательно, при этом антиген раковых клеток представляет собой HER2, CD19, CD20 или GD2.

18. Способ обеспечения Т-клеточного ответа у субъекта-человека, имеющего опухоль, включающий введение субъекту эффективного количества трансгенных клеток по п. 17.

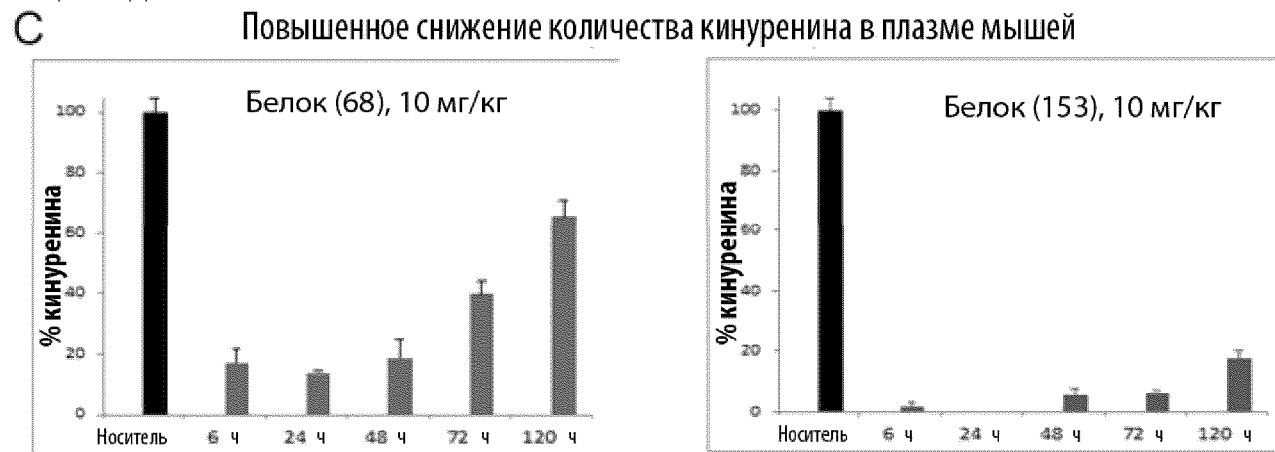
19. Композиция, содержащая эффективное количество трансгенных клеток по п. 17, для применения в лечении субъекта, имеющего опухоль, необязательно при этом:

(a) трансгенные клетки являются аутологичными; или

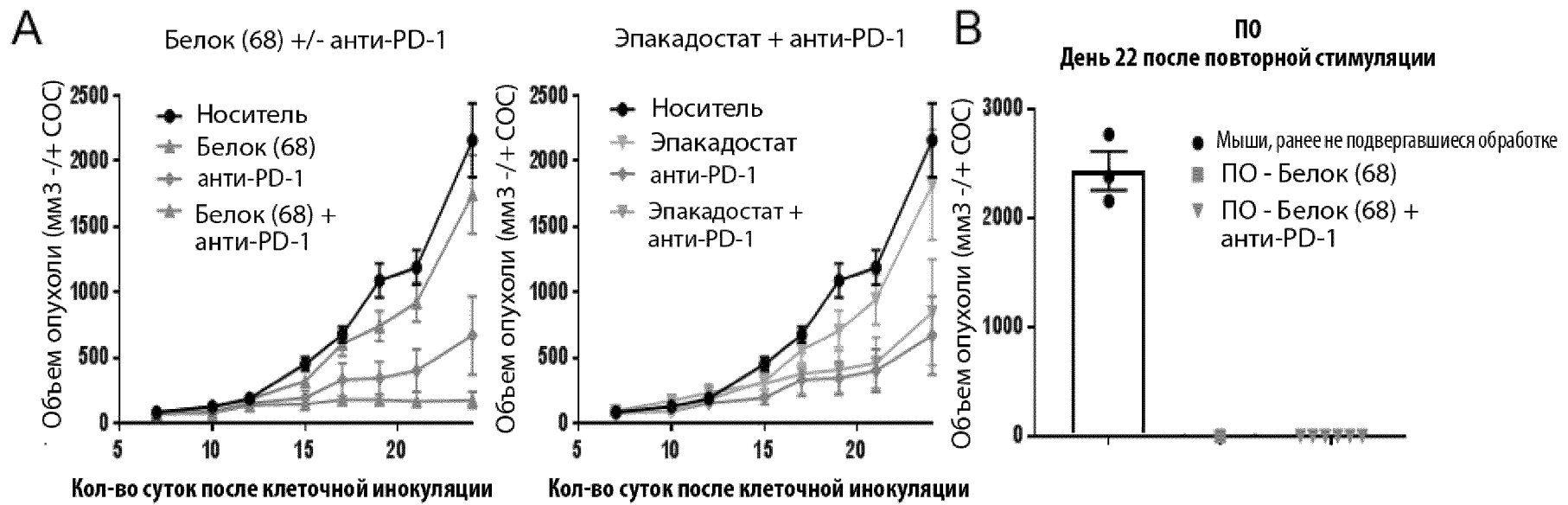
(b) трансгенные клетки являются гетерологичными.

20. Применение фермента кинурениназы по любому из пп. 1-9 или нуклеиновой кислоты по п. 10 в производстве лекарственного средства для лечения опухоли.

По доверенности

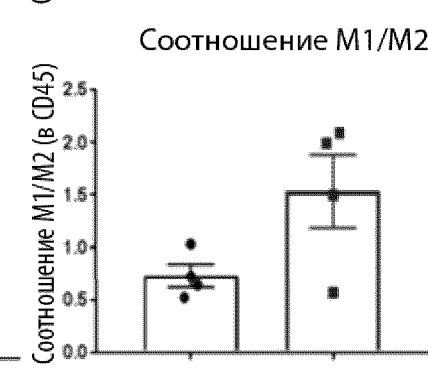
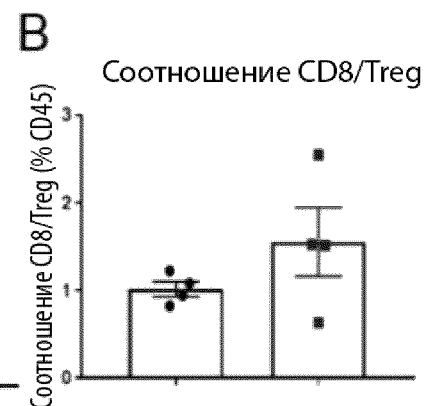
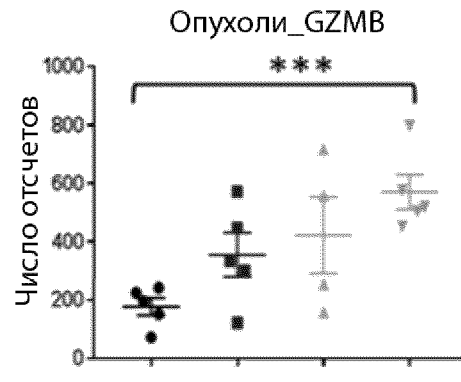
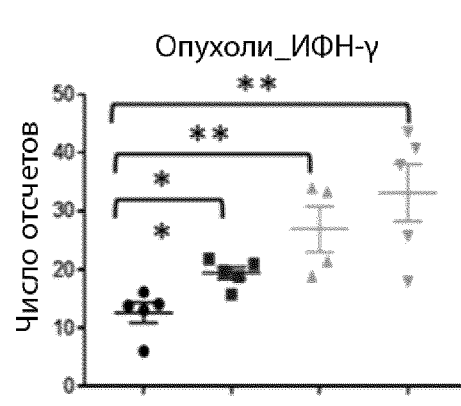
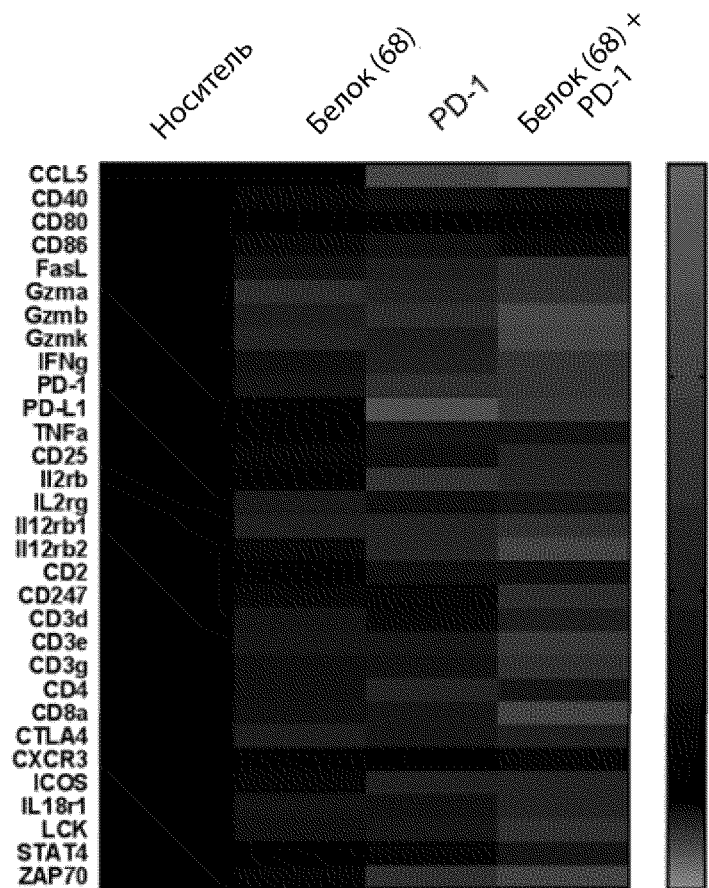


Фиг. 1А-С

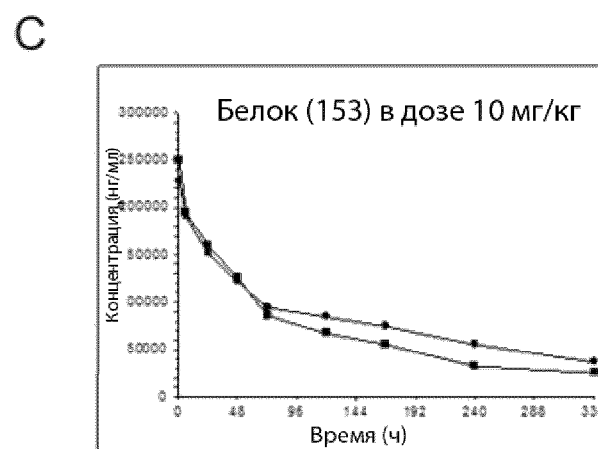
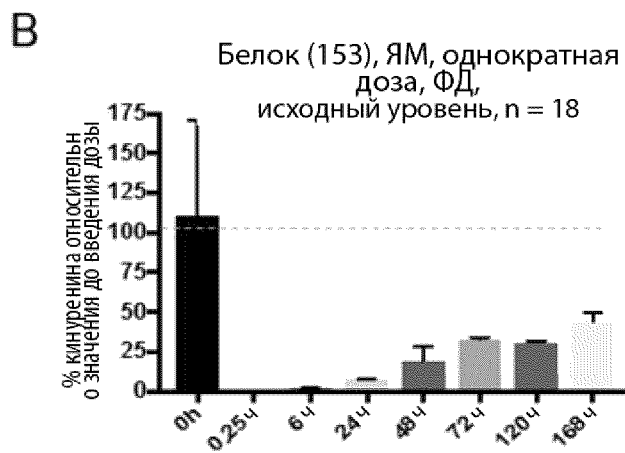
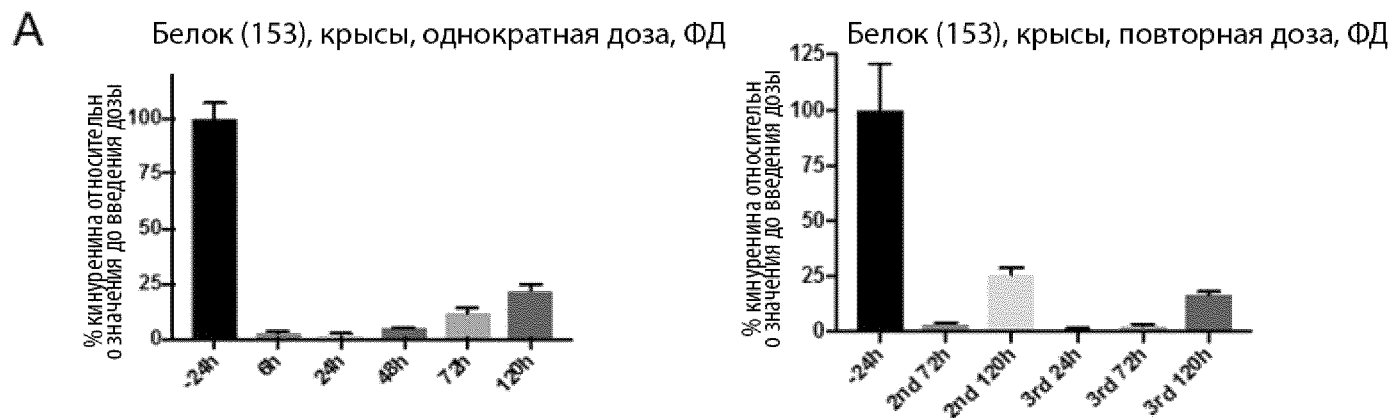


Фиг. 2А-В

**A** Тепловая карта\_Активация Т-клеток



Фиг. 3А-В



Вариант (доза в мг/кг)	С0 (мкг/мл)	ППК <sub>БЕСК</sub> (ч*мкг/мл)	T1/2 (ч)
Белок (153) в дозе 10 мг/кг	240	31850	152

Фиг. 4А-С