

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042392**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.09**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201792441**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.05.06**

---

(54) **ДОМЕНЫ ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С  
ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКИМ МЕМБРАННЫМ АНТИГЕНОМ**

---

(31) **62/157,772**

(56) WO-A2-2008066752  
WO-A1-2012162418  
WO-A2-2014081944  
WO-A2-2011137319  
WO-A2-2010051274

(32) **2015.05.06**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/031295**

(87) **WO 2016/179534 2016.11.10**

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

(72) Изобретатель:  
**Кардосо Роза, Дим Майкл, Голдберг  
Шалом, Хиун Лайнус, Джекобс  
Стивен, Клейн Донна, О'Нил Карин,  
Спинка-Домс Трэйси (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,  
Соколов Р.А. (RU)**

---

(57) PSMA-связывающие домены FN3, их конъюгаты, выделенные нуклеотиды, кодирующие молекулы, векторы, клетки-хозяева и способы их получения используются в создании терапевтических молекул, лечении и диагностике заболеваний и расстройств.

**B1**

**042392**

**042392  
B1**

### Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к молекулам, связывающимся с простатспецифическим мембранным антигеном, и к способам получения и применения этих молекул.

### Предпосылки к созданию изобретения

Простатспецифический мембранный антиген (PSMA), также известный как глутаматкарбоксипептидаза II или N-ацетилированная альфа-связанная кислая дипептидаза I, представляет собой димерный трансмембранный гликопротеин типа 2. PSMA расщепляет несколько субстратов, включая фолат и N-ацетил-L-аспартил L-глутамат, и экспрессируется в ряде тканей, при этом наибольшая экспрессия наблюдается в предстательной железе и меньшая в тонком кишечнике, центральной и периферической нервной системе, почках и легких. PSMA конститутивно интернализируется через покрытые клатрином ямки.

PSMA представляет собой хорошо изученный антиген клеточной мембраны, связанный с раком предстательной железы, который часто суперэкспрессируется при интраэпителиальной неоплазии предстательной железы (ПИН), то есть состоянии, при котором некоторые клетки предстательной железы начинают выглядеть и вести себя ненормально, первичных и метастатических раковых заболеваниях и в новообразованных сосудах других солидных опухолей (например, молочной железы, легкого, мочевого пузыря, почки) (Chang et al., Clin Cancer Res 5:2674-2681, 1999, Liu et al., Cancer Res 57:3629-3634, 1997, Silver et al., Clin Cancer Res 3:81-85, 1997; Bostwick et al., Cancer 82:2256-2261, 1998). Уровни экспрессии PSMA коррелируют с прогрессированием заболевания и количеством баллов по шкале Глисона. Экспрессия PSMA увеличивается при метастатическом заболевании, гормонально-рефрактерных случаях и поражениях более высокой степени и дополнительно усиливается при нечувствительных к андрогенам опухолях (Su et al., Cancer Res 55:1441-1443, 1995, Kawakami et al., 57:2321-2324, 1997, Wright et al., Urology 48:326-334, 1996).

Рак предстательной железы является основным видом рака у мужчин и находится на 2-м месте среди причин смерти от рака. По всему миру ежегодно регистрируется приблизительно 1100000 новых случаев и 300000 смертельных исходов, что составляет около 4% всех смертельных случаев по причине рака. Согласно оценкам ожидается, что из каждых 6 мужчин у 1 будет диагностировано это заболевание. В США более 90% случаев рака предстательной железы выявляют на локальной или региональной стадии. На этих ранних стадиях уровень 5-летней выживаемости составляет практически 100%. Однако при метастазировании рака уровень 5-летней выживаемости уменьшается до около 28%. Локализованный рак предстательной железы часто можно сдерживать путем исключения эндокринной функции.

Существующие способы лечения рака предстательной железы включают хирургическое вмешательство, радиационную и гормональную терапии. Однако опухолевые клетки часто становятся нечувствительными к андрогенам, и остается ограниченное количество вариантов лечения. Как правило, к гормональной терапии последовательно добавляют противораковую вакцину сипулейцел-Т, радиофармацевтический агент (такой как хлорид радия-223), вторичные гормональные терапевтические средства (такие как абиратерон или энзалутамид) и/или химиотерапевтические средства (доцетаксел и кабацитаксел).

Моноклональные антитела, оказывающие целевое воздействие на PSMA, оценивали при применении в клинике как в качестве диагностических агентов для визуализации, так и в качестве конъюгатов антитела с лекарственным средством. В наиболее широко используемых конъюгатах антитела с лекарственным средством (ADC), оказывающих целевое воздействие на PSMA, используется одно и то же гуманизованное/деиммунизированное моноклональное антитело (mAb) к PSMA J591. По меньшей мере три различных ADC, в которых используются J591, были оценены в клинических исследованиях с использованием различных линкеров и цитотоксических молекул. Компания Millenium Pharmaceuticals завершила клинические исследования фазы I, в которых оценивали MLN2704, представляющий собой моноклональное антитело к PSMA, конъюгированное с мейтансином с помощью дисульфидных связей. Компания Progenics применяла технологию Seattle Genetics для связывания J591 с монометил ауристатином E (MMAE) при помощи валин-цитруллинового линкера, а ADCT начинает клинические исследования конъюгата пирролобензодиазепина (PBD) с J591. До настоящего времени ограниченная клиническая эффективность была сопряжена с выраженной токсичностью и короткими периодами полужизни в сыворотке, что, вероятно, связано с высоким поглощением печенью (Morris et al., Clin Cancer Res 13:2707-2713, 2007). Тем не менее в двух отдельных клинических исследованиях было получено подтверждение уменьшения концентраций PSA/СТС после повторного лечения ADC к PSMA, в особенности в высоких дозах (D Petrylak, Genitourinary Cancers Symposium, 2014, Galsky et al., J Clin Oncol 26:2147-2154, 2008, D Petrylak, ASCO 2014). В случае компании Progenics два дозозимитирующих токсических эффекта привели к смерти в результате сепсиса по причине нейтропении (D Petrylak, ASCO 2014).

Хотя каждый из этих способов лечения способен замедлять рост рака в течение нескольких месяцев и ослаблять симптомы, вызванные заболеванием, в конечном счете заболевание становится резистентным к ним.

Таким образом, существует потребность в дополнительных и улучшенных терапевтических средствах для лечения рака предстательной железы и других видов рака с суперэкспрессией PSMA.

### Сущность изобретения

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA) SEQ ID NO: 144.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA SEQ ID NO: 144, причем домен FN3 перекрестно реагирует с PSMA Macaca Fascicularis SEQ ID NO: 32 или PSMA Pan troglodytes SEQ ID NO: 33.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA SEQ ID NO: 144, где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, которая на 89% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41 или которая имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA SEQ ID NO: 144; где домен FN3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA) SEQ ID NO: 144, конъюгированный с цитотоксическим агентом или поддающийся обнаружению меткой.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3 по изобретению.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с изобретением.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор в соответствии с изобретением.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ получения домена FN3 по изобретению, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина по изобретению в условиях, в которых экспрессируется домен FN3 по изобретению, и очистку домена FN3.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую домен FN3 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения пациента, имеющего рак, характеризующийся суперэкспрессией PSMA, который включает введение терапевтически эффективного количества домена FN3 по изобретению, конъюгированного с цитотоксическим агентом, требующему этого пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой диагностический набор, содержащий домен FN3 по изобретению. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой диагностический или захватный агент, содержащий домен FN3 по изобретению.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ обнаружения PSMA-экспрессирующих клеток в биологической пробе, включающий обработку биологической пробы диагностическим агентом, содержащим домен FN3 по изобретению, и оценку связывания биологической пробы с таким диагностическим агентом, содержащим домен FN3 по изобретению.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ выделения PSMA-экспрессирующих клеток в биологической пробе, включающий обработку биологической пробы захватным агентом, содержащим домен FN3 по изобретению, и выделение части биологической пробы, которая связывается с таким захватным агентом, содержащим домен FN3.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ обнаружения PSMA-экспрессирующих опухолевых клеток у пациента, включающий введение пациенту домена FN3 по изобретению и обнаружение связывания домена FN3 с PSMA-экспрессирующими опухолевыми клетками у пациента.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ доставки терапевтической молекулы в PSMA-экспрессирующие опухолевые клетки, включающий введение домена FN3 по изобретению пациенту, имеющему PSMA-экспрессирующую опухоль.

### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано биораспределение нецелевого центриина, меченного <sup>89</sup>Zr, после внутривенного введения самцам мышей линии NSG.

На фиг. 2А показана общая кристаллическая структура PSMA-связывающего домена FN3 P233FR9\_H10 (H10) в комплексе с димером PSMA яванского макака, демонстрирующая, что H10 связывается с областью вблизи активного сайта PSMA. Атомы цинка (Zn) указывают на положение активного сайта PSMA, N- и C-концы молекул PSMA и H10 обозначены для одного из комплексов. Обозначено примерное положение клеточной мембраны.

На фиг. 2В показана кристаллическая структура домена FN3 H10 в комплексе с PSMA яванского макака. Показаны бета-цепи А, В, С, D, Е, F и G в домене FN3 H10. Показаны отрицательно заряженные остатки в петле CD H10 (остатки W38, D39, D40, D41 и E43), которые вставлены в положительно заряженный вход активного сайта PSMA. Нумерация остатков H10 приведена в соответствии с SEQ ID NO: 41.

На фиг. 2С показана кристаллическая структура домена FN3 H10 в комплексе с PSMA яванского макака. На фигуре показаны контактирующие остатки W38, D39, D40, D41 и E43 домена H10. Показаны некоторые из остатков PSMA яванского макака, которые контактируют с H10 (R511, K514 и K545), координируют атомы цинка (H377, D387, E424, E425, D453 и H553) или формируют полость активного сайта (R536 и R534). На фигуре отмечены бета-цепи H10 С, D, F и G. Нумерация остатков H10 и PSMA яванского макака соответствует SEQ ID NO: 41 и 141 соответственно.

На фиг. 3А показано изображение крупным планом кристаллической структуры, объединяющее сайт между доменом FN3 H10 и PSMA яванского макака. Показаны контактирующие остатки A32, W36, W38-D41, E43, A44, V46, G64, P68, Y70, A72, W79, F81, P82, A85 и I86 домена FN3 H10. Показаны контактирующие остатки Y460, K499-P502, P504, R511, K514, N540, W541, K545, F546, F488, K610, N613 и I614 PSMA яванского макака. Нумерация остатков H10 и PSMA яванского макака соответствует SEQ ID NO: 41 и 141 соответственно.

На фиг. 3В показана карта взаимодействий между доменом FN3 H10 и контактирующими остатками PSMA яванского макака. Отсечение длиной 4 Å использовали для определения контактирующих остатков. Центирин и остатки PSMA яванского макака показаны в серых и белых прямоугольниках, соответственно, взаимодействия Ван-дер-Ваальса показаны пунктирными линиями, а водородные связи показаны сплошными линиями со стрелками, обозначающими водородные связи основной цепи и указывающими на атомы основной цепи. Нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 41 (H10) и SEQ ID NO: 141 (PSMA яванского макака).

На фиг. 4А показано выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточных доменов PSMA человека (h) и яванского макака (c). Контактующие остатки H10 подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Остатки, которые отличаются в PSMA человека и яванского макака, заштрихованы. Все остатки PSMA яванского макака, взаимодействующие с H10, сохраняются в человеческом PSMA за исключением N613. Внеклеточный домен (ECD) PSMA человека; SEQ ID NO: 143. ECD PSMA яванского макака: SEQ ID NO: 32

На фиг. 4В показаны остатки домена FN3 H10, вступающие в контакт с PSMA яванского макака. Контактующие остатки подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Аминокислотная последовательность H10 показана в SEQ ID NO: 41.

На фиг. 5 показано положение остатков N6, R11, T22, D25, A26, S52, E53, K62 центирин H10 и N- и C-концов, которые представляют собой возможные сайты для химической конъюгации, в кристаллической структуре H10, связанного с PSMA яванского макака. Контактующие области центирин/PSMA показаны черным цветом. На фигуре отмечены бета-цепи H10 С, D, F и G. Нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 41 (H10).

На фиг. 6 показано сравнение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) различных линий опухлевых клеток, окрашенных конъюгатом центирин-фикоэритрин (PE) к PSMA (черный), и антителом к PSMA, конъюгированным с PE (белый).

На фиг. 7А показан ряд изображений в средстве визуализации и просмотра объектов CellTracks Analyzer II, на которых показаны клетки LNCaP, окрашенные DAPI, антителом к цитокератину, конъюгированным с FITC, антителом к CD45, конъюгированным с APC, и конъюгатом центирин-PE к PSMA. На миниатюрах показано справа налево: окрашивание PSMA-PE, сигнал CD45-APC, окрашенные DAPI ядра, реактивность цитокератин-FITC и, в заключение, наложение окрашивания цитокератин-FITC и DAPI. Клетка должна иметь ядро, экспрессировать цитокератин и быть отрицательной в отношении CD45, чтобы она была зарегистрирована как CTC. CTC должна иметь положительный сигнал в отношении PSMA, чтобы она была учтена как PSMA-положительная CTC.

На фиг. 7В показан ряд изображений в средстве визуализации и просмотра объектов CellTracks Analyzer II, на которых показаны клетки 22Rv1, окрашенные DAPI, антителом к цитокератину, конъюгированным с FITC, антителом к CD45, конъюгированным с APC, и конъюгатом центирин-PE к PSMA. На миниатюрах показано справа налево окрашивание PSMA-PE, сигнал CD45-APC, окрашенные DAPI ядра, реактивность цитокератин-FITC и, в заключение, наложение окрашивания цитокератин-FITC и DAPI. Клетка должна иметь ядро, экспрессировать цитокератин и быть отрицательной в отношении CD45, чтобы она была зарегистрирована как CTC. CTC должна иметь положительный сигнал в отношении PSMA, чтобы она была учтена как PSMA-положительная CTC.

На фиг. 7С показан ряд изображений в средстве визуализации и просмотра объектов CellTracks Analyzer II, на которых показаны клетки PC3, окрашенные DAPI, антителом к цитокератину, конъюгированным с FITC, антителом к CD45, конъюгированным с APC, и конъюгатом центирин-PE к PSMA. На миниатюрах показано справа налево окрашивание PSMA-PE, сигнал CD45-APC, окрашенные DAPI ядра, реактивность цитокератин-FITC и, в заключение, наложение окрашивания цитокератин-FITC и DAPI.

Клетка должна иметь ядро, экспрессировать цитокератин и быть отрицательной в отношении CD45, чтобы она была зарегистрирована как CTC. CTC должна иметь положительный сигнал в отношении PSMA, чтобы она была учтена как PSMA-положительная CTC.

На фиг. 7D показан ряд изображений в средстве визуализации и просмотра объектов CellTracks Analyzer II, на которых показаны клетки SKBR3, окрашенные DAPI, антителом к цитокератину, конъюгированным с FITC, антителом к CD45, конъюгированным с APC, и конъюгатом центирин-PE к PSMA. На миниатюрах показано справа налево окрашивание PSMA-PE, сигнал CD45-APC, окрашенные DAPI ядра, реактивность цитокератин-FITC и, в заключение, наложение окрашивания цитокератин-FITC и DAPI. Клетка должна иметь ядро, экспрессировать цитокератин и быть отрицательной в отношении CD45, чтобы она была зарегистрирована как CTC. CTC должна иметь положительный сигнал в отношении PSMA, чтобы она была учтена как PSMA-положительная CTC.

#### **Подробное описание изобретения**

В контексте настоящего изобретения термин "домен фибронектина типа III (FN3)" ("домен FN3") относится к домену, часто встречающемуся в белках, включая фибронектины, тенасцин, белки внутриклеточного цитоскелета, цитокиновые рецепторы и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89:8990-8994, 1992; Meinke et al., J Bacteriol 175:1910-1918, 1993; Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990). Примеры доменов FN3 представляют собой 15 разных доменов FN3, присутствующих в тенасцине С человека, 15 разных доменов FN3, присутствующих в фибронектине (FN) человека, и синтетические домены FN3 неприродного происхождения, описанные, например, в патенте США № 8278419. Отдельные домены FN3 обозначают по номеру домена и названию белка, например 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина (FN10).

В контексте настоящего изобретения термин "центририн" обозначает домен FN3, основанный на консенсусной последовательности из 15 различных доменов FN3, присутствующих в человеческом тенасцине С.

Термин "захватный агент" относится к веществам, которые связываются с конкретным типом клеток и позволяют отделить эту клетку от других клеток. Примеры захватных агентов включают в себя, без ограничений, магнитные гранулы, ферромагнитные жидкости, инкапсулирующие реагенты и т.п.

Термин "биологическая проба" относится к крови, ткани, костному мозгу, мокроте и т.п.

Термин "диагностический реагент" относится к любому веществу, которое можно использовать для анализа биологической пробы вне зависимости от того, поставляется ли такое вещество в диагностическом наборе в виде отдельного вещества или в комбинации с другими веществами.

В контексте настоящего изобретения термин "замена" или "замещенный", "мутация" или "мутированный" относится к изменению, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов в последовательность полипептида или полинуклеотида для создания варианта этой последовательности.

Термин "рандомизация", "рандомизированный", "диверсифицированный" или "диверсификация" в контексте настоящего изобретения относится к выполнению по меньшей мере одной замены, вставки или делеции в последовательности полинуклеотида или полипептида.

В контексте настоящего изобретения термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например заменами, вставками или делециями.

В контексте настоящего изобретения термин "специфически связывается" или "специфическое связывание" относится к способности домена FN3 по изобретению связываться с заданным антигеном с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $1 \times 10^{-6}$  М или менее, например около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-13}$  М или менее. Как правило, домен FN3 по изобретению связывается с заданным антигеном (т.е. PSMA человека) с  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифического антигена (например, BSA или казеина) по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, оборудования Proteon (BioRad). Однако выделенный домен FN3 по изобретению, который специфически связывается с человеческим PSMA, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например с таким же заданным антигеном другого вида (гомологи), например Macaca Fascicularis (яванский макак, супо) или Pan troglodytes (шимпанзе).

При использовании в настоящем описании термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывается домен FN3 по изобретению. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и они могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "библиотека" в настоящем описании относится к группе вариантов. Библиотека может со-

стоять из вариантов полипептида или полинуклеотида.

В контексте настоящего изобретения термин "стабильность" относится к способности молекулы сохранять свернутое состояние в физиологических условиях таким образом, чтобы сохранять по меньшей мере одну из своих обычных функциональных возможностей, например способность связываться с данным антигеном, таким как PSMA человека.

Человеческий PSMA в контексте настоящего изобретения относится к хорошо известному гликопротеину типа II массой около 100 кДа, имеющему короткий внутриклеточный домен (остатки 1-18), трансмембранный домен (остатки 19-43) и внеклеточный домен (остатки 44-750). Аминокислотная последовательность зрелой PSMA человека приведена в SEQ ID NO: 144.

В контексте настоящего изобретения применяемые на взаимозаменяемой основе термины "суперэкспрессия", "суперэкспрессируемый" и "суперэкспрессирующий" относятся к раковой или злокачественной клетке, которая имеет на поверхности повышенные до определенной степени уровни PSMA по сравнению с нормальной клеткой из ткани того же типа. Такая суперэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Суперэкспрессию PSMA можно измерить, применяя хорошо известные анализы, используя, например, ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно или дополнительно уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих PSMA, можно измерить в клетке, применяя флуоресцентную гибридизацию *in situ*, саузэрн-блоттинг или ПЦР. Суперэкспрессия PSMA означает, что уровень PSMA на поверхности клетки по меньшей мере в 1,5 раза выше по сравнению с уровнем нормальной клетки.

В контексте настоящего изобретения термин "Tencon" относится к синтетическому домену фибронектина типа III (FN3) с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и описанному в патентной публикации США № US 2010/0216708.

В контексте настоящего изобретения термин "раковая клетка" или "опухолевая клетка" относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке либо *in vivo*, либо *ex vivo*, и в культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые не обязательно затрагивают получение нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфицированием трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляется, например, в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркеров, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли или ее подавлении у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши с мутацией *nude* и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Выражение "ингибирует рост" (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) относится к измеримому снижению роста клеток *in vitro* или *in vivo* при приведении их в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических или лекарственных средств по сравнению с ростом тех же клеток, растущих в соответствующих контрольных условиях, хорошо известных специалистам в данной области. Ингибирование роста клетки *in vitro* или *in vivo* может составлять по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Ингибирование роста клеток может происходить посредством различных механизмов, например апоптоза, некроза, или посредством ингибирования пролиферации клеток или посредством лизиса клеток.

Термин "вектор" обозначает полинуклеотид, способный к воспроизведению внутри биологической системы или который можно перемещать между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, способствующие воспроизведению или сохранению этих полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "экспрессионный вектор" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для прямой трансляции полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "полипептид" или "белок" обозначает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее чем около 50 аминокислот, могут называться "пептидами".

В контексте настоящего изобретения термин "валентный" относится к наличию в молекуле уста-

новленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины "одновалентный", "двухвалентный", "четырёхвалентный" и "шестивалентный" относятся к наличию в молекуле одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена.

В контексте настоящего изобретения термин "в комбинации с" означает, что пациенту можно вводить два или более терапевтических средства вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термин "синергия", "синергизм" или "синергический" означает эффект комбинации, превышающий ожидаемый аддитивный эффект.

#### **Композиции согласно настоящему изобретению**

Настоящее изобретение относится к доменам FN3, связывающимся с человеческим PSMA, и к доменам FN3, связывающимся с PSMA и конъюгированные с токсинами или поддающимися обнаружению метками. Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домены FN3 по изобретению, или к комплементарным к ним нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и к способам их получения и применения.

#### **PSMA-связывающие молекулы**

Настоящее изобретение относится к доменам фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с человеческим простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA), необязательно конъюгированные с токсином или поддающейся обнаружению меткой. Эти молекулы могут широко применяться в терапевтических и диагностических целях. Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим домены FN3 по изобретению, или к комплементарным к ним нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и к способам их получения и применения.

Домены FN3 по изобретению связываются с PSMA с высокой аффинностью и интернализируются в PSMA-экспрессирующие клетки, таким образом обеспечивая эффективный способ доставки терапевтических средств в опухолевые клетки.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA) SEQ ID NO: 144.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, домен FN3 по изобретению перекрестно реагирует с PSMA Macaca Fascicularis SEQ ID NO: 32 или PSMA Pan troglodytes SEQ ID NO: 33.

Домен FN3 по изобретению может связываться с PSMA человека, Macaca Fascicularis и/или Pan troglodytes с константой диссоциации (KD) менее чем около  $1 \times 10^{-7}$  M, например менее чем около  $1 \times 10^{-8}$  M, менее чем около  $1 \times 10^{-9}$  M, менее чем около  $1 \times 10^{-10}$  M, менее чем около  $1 \times 10^{-11}$  M, менее чем около  $1 \times 10^{-12}$  M или менее чем около  $1 \times 10^{-13}$  M при определении методом поверхностного плазмонного резонанса или методом кинетического исключения (Kinexa), известным специалистам в данной области. Измеренная аффинность взаимодействия в конкретной паре домен FN3-аНТпгеН может варьировать при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) выполняют с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления PSMA-связывающие домены FN3 содержат иницирующий метионин (Met), связанный с N-концом молекулы.

В некоторых вариантах осуществления PSMA-связывающие домены FN3 содержат цистеин (Cys), связанный с C-концом домена FN3.

Добавление N-концевого Met и/или C-концевого Cys может способствовать экспрессии и/или конъюгации с молекулами, увеличивающими период полужизни.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA, причем домен FN3 ингибирует ферментативную активность человеческого PSMA. Ферментативная активность PSMA может быть измерена с использованием стандартных способов. Например, может быть использован гидролиз обнаруживаемого PSMA или меченого субстрата PSMA. Примерами субстратов PSMA, которые могут быть использованы, являются N-ацетиласпартилглутамат (NAAG), фолат полиглутамат, метотрексат три-гамма-глутамат, метотрексат ди-гамма-глутамат, птероилпентаглутамат и их производные. Субстрат может быть мечен, например радиоактивным маркером, хемилюминесцентным маркером, ферментным маркером, хромогенным маркером или другими поддающимися обнаружению маркерами. Приемлемые способы обнаружения активности PSMA описаны, например, в патенте США № 5981209 или публикации патента США № 2006/0009525. Выделенный домен FN3, связывающийся с PSMA, изобретения ингибирует ферментативную активность человеческого PSMA, если молекула ингибирует активность человеческого PSMA более чем на около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с образцом, не содержащим домена FN3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем описании, выделен-

ный домен FN3 содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, выделенный домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, которая на 89% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, домен FN3 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA, содержит остаток цистеина в по меньшей мере одном положении остатка, соответствующем положениям остатков 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 61 в SEQ ID NO 1 или на С-конце.

Замены, приводящие к внедрению цистеина в белковую последовательность, могут быть использованы для химической конъюгации небольших молекул, таких как цитотоксические агенты, поддающиеся обнаружению метки, полиэтиленгликоль и/или нуклеиновые кислоты, с доменом FN3 с помощью стандартных химических методов.

В некоторых вариантах осуществления домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, конкурирует за связывание человеческого PSMA с доменом FN3 с SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, связывается с областью KKSPSPEFSGMPRISK (SEQ ID NO: 159) и NWETNKF (SEQ ID NO: 160) человеческого PSMA.

Эпитоп человеческого PSMA, связываемый с доменом FN3 по изобретению, включает в себя некоторые или все остатки в пределах аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 159 или SEQ ID NO: 160. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, эпитоп, связываемый с доменом FN3 по изобретению, содержит по меньшей мере одну аминокислоту в области KKSPSPEFSGMPRISK (SEQ ID NO: 159) и NWETNKF (SEQ ID NO: 160) человеческого PSMA (SEQ ID NO: 144). В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, эпитоп, связываемый с доменом FN3 по изобретению, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть или семь аминокислот в области KKSPSPEFSGMPRISK (SEQ ID NO: 159) и по меньшей мере две, три, четыре, пять или шесть аминокислот в области NWETNKF (SEQ ID NO: 160) человеческого PSMA (SEQ ID NO: 144).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, домен FN3 по изобретению связывается с человеческим PSMA в остатках K499, K500, S501, P502, P504, R511, K514, N540, W541, E542, N544, K545 и F546 (нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 144).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, домен FN3 по изобретению дополнительно связывается с человеческим PSMA в остатках R181, Y460, F488, K610 и/или 1614.

Кристаллическая структура домена FN3 P2 33FR9 H10 была растворена в комплексе с PSMA яванского макака. Так как контактирующие остатки в PSMA человека и яванского макака являются идентичными за исключением одного остатка, предполагается, что P233FR9 H10 будет связываться с PSMA человека в тех же остатках эпитопа, в которых он связывается с PSMA яванского макака.

Домены FN3 могут быть оценены в отношении конкуренции с эталонной молекулой за связывание с человеческим PSMA с помощью хорошо известных способов *in vitro*. В примере способа клетки CHO, рекомбинантно экспрессирующие человеческий PSMA, могут быть инкубированы с немеченой эталонной молекулой в течение 15 мин при 4°C с последующим инкубированием с избытком тестируемого домена FN3, имеющего флуоресцентную метку, в течение 45 мин при 4°C. После промывания в фосфатно-солевом буферном растворе с бычьим сывороточным альбумином (PBS/BSA) можно проводить измерение флуоресценции проточной цитометрией с помощью стандартных методов. В другом примере способа внеклеточный участок человеческого PSMA может быть нанесен на поверхность планшета для ИФА. В течение около 15 мин может добавляться избыток немеченой эталонной молекулы, а впоследствии могут добавляться биотинилированные тестовые домены FN3. После промывок в PBS/Tween можно выявлять связывание тестового биотинилированного домена FN3 с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидина и обнаруживать сигнал с помощью стандартных методов. Очевидно, что в конкурентных анализах эталонная молекула может быть меченой, а тестируемый домен FN3 - немеченым. Тестируемый домен FN3 конкурирует с эталонной молекулой, если эталонная молекула ингибирует связывание тестируемого домена FN3 или тестируемый домен FN3 ингибирует связывание эталонной молекулы на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 100%. Можно дополнительно определить эпитоп тестового домена FN3, например, путем пептидного картирования или посредством анализов с защитой водорода/дейтерия с помощью известных методов, или же посредством определения структуры кристалла. Пример эталонного домена FN3 представляет собой домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

Домены FN3, связывающиеся с той же областью на человеческом PSMA, что и домен FN3 с SEQ ID NO: 41, могут быть получены, например, путем иммунизации мышей пептидами, имеющими аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 159 и 160, с помощью стандартных способов, а также, как описано в настоящем описании. Домены FN3 могут быть дополнительно оценены, например, посредством анализа конкуренции между доменом FN3 с SEQ ID NO: 41 и тестируемым доменом FN3 за связывание с человеческим PSMA с помощью хорошо известных способов *in vitro* и как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления выделенный домен FN3, который специфически связывается с человеческим PSMA изобретения, конъюгирован с поддающейся обнаружению меткой.

Поддающаяся обнаружению метка включает композиции, которые при конъюгировании с доменом FN3 по изобретению превращают последний в поддающийся обнаружению посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств. Примеры меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, часто используемые в ИФА), биотин, дигоксигенин или гаптены. Специфические радиоактивные метки включают в себя наиболее распространенные присутствующие на рынке изотопы, включая, например,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  и  $^{68}\text{Ga}$ . Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т.п.

Домены FN3, которые специфически связываются с человеческим PSMA, конъюгированные с поддающейся обнаружению меткой, могут использоваться в качестве агентов для визуализации для оценки распределения опухоли, диагностики наличия опухолевых клеток и/или рецидива опухоли.

В некоторых вариантах осуществления домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим PSMA изобретения, конъюгированы с цитотоксическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающий ферментативной активностью, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоактивный конъюгат).

Домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, конъюгированные с цитотоксическим агентом, могут использоваться для направленной доставки цитотоксического агента в PSMA-экспрессирующую опухолевую клетку и внутриклеточного накопления в ней, причем системное введение этих неконоъюгированных цитотоксических агентов может приводить к недопустимым уровням токсичности для нормальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой дауномицин, доксорубин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, мейтансиноиды или калихеамицин.

Цитотоксический агент может индуцировать цитотоксический и цитостатический эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой токсины с ферментативной активностью, такие как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *omordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой радионуклид, такой как  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{186}\text{Re}$ .

Конъюгаты доменов FN3 по изобретению и цитотоксического агента получают с использованием различных бифункциональных агентов для соединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HCL), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(*p*-азидобензоил)гександиамида), производные бис-диазония (такие как бис-(*p*-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фторными группами (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой долостатины или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристин или монометилауристин фенилаланин. Примеры молекул описаны в патентах США № 5635483 и № 5780588. Показано, что долостатины и ауристины блокируют динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки (Woyke et al. (2001) *Antimicrob Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) и обладают противораковой и противогрибковой активностью. Функциональная группа лекарственного средства долостатина или ауристина может быть присоединена к домену FN3, включающему в себя молекулу изобретения, посредством N (амино) конца или C (карбоксыльного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства

(WO 02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в домен FN3.

В некотором варианте осуществления домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, удаляется из крови посредством почечного клиренса.

**Выделение PSMA-связывающих доменов FN3 из библиотеки, основанной на последовательности Tенсон**

Tенсон (SEQ ID NO: 1) представляет собой домен фибронектина типа III (FN3) неприродного происхождения, разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 те-нацина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патентной публикации США № 2010/0216708). Кристаллическая структура Tенсон демонстрирует шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, причем бета-тяжи обозначены как А, В, С, D, E, F и G, а петли обозначены как АВ, ВС, CD, DE, EF и FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; патент США № 6,673,901). Эти петли или выбранные остатки в пределах каждой петли могут быть рандомизированы для конструирования библиотек доменов фибронектина типа III (FN3), которые могут применяться для выбора новых молекул, связывающихся с PSMA. В табл. 1 показаны положения и последовательности каждой петли и бета-тяжа в Tенсон (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, библиотека, разработанная на основе последовательности Tенсон, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли ВС и FG, например описанные ниже библиотеки TCL1 или TCL2. Петля ВС Tенсон имеет длину 7 аминокислот. Таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tенсон с диверсификацией по петле ВС можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Петля FG Tенсон имеет длину 7 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tенсон с диверсификацией по петле FG можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Дополнительного разнообразия в петлях библиотек Tенсон можно достичь путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, петли FG и/или ВС можно удлинить на 1-22 аминокислоты или уменьшить на 1-3 аминокислоты. Петля FG Tенсон имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител находится в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела в 4-28 остатков. Например, петлю FG можно дополнительно диверсифицировать по длине, удлив петлю на дополнительные 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

Библиотека, разработанная на основе последовательности Tенсон, также может иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжей и по меньшей мере одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-тяжах С и F и в петлях CD и FG (поверхность С-CD-F-FG). Конфигурация библиотеки, основанной на альтернативной поверхности Tенсон С-CD-F-FG, описана в публикации патента США № US 2013/0226834. Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tенсон, также включают библиотеки на основе вариантов Tенсон, таких как варианты Tенсон, имеющие замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1), и такие варианты демонстрируют повышенную термостабильность. Примеры вариантов Tенсон описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают в себя Tенсон27 (SEQ ID NO: 4), имеющую замены E11R, L17A, N46V и E86I по сравнению с Tенсон с SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Домен FN3	Tенсон (SEQ ID NO: 1)
Тяж А	1-12
Петля АВ	13-16
Тяж В	17-21
Петля ВС	22-28
Тяж С	29-37
Петля CD	38-43
Тяж D	44-50
Петля DE	51-54
Тяж E	55-59
Петля EF	60-64
Тяж F	65-74
Петля FG	75-81
Тяж G	82-89

Библиотеки на основе Tенсон и другой последовательности FN3 могут быть рандомизированы по выбранным положениям остатков с использованием случайного или определенного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющие случайные замены, можно создать с использованием кодонов

NNK, которые кодируют все 20 аминокислот природного происхождения. В других схемах диверсификации могут быть применены кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов можно применять кодоны NNS. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® ([http://www\\_sloning\\_com](http://www_sloning_com)). В данной технологии применяют библиотеку предварительно полученных двухцепочечных триплетов, которые служат в качестве универсальных строительных блоков, достаточных для процессов синтеза тысяч генов. В библиотеке триплетов представлены все возможные комбинации последовательностей, необходимые для построения любой желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, можно выделить путем получения библиотеки FN3, такой как библиотека Tencon, с использованием cis-дисплея для лигирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментом ДНК, кодирующим RepA, для создания пула комплексов белок-ДНК, образованных после трансляции *in vitro*, причем каждый белок стабильно связан с кодирующей его ДНК (патент США № 7842476; Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 2806-2810, 2004), и анализа библиотеки на специфическое связывание с PSMA любым способом, известным в данной области или описанным в примере. Примеры хорошо известных способов, которые можно применять, представляют собой ИФА, сэндвич-ИФА и конкурентный и неконкурентный анализы (см., например, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Идентифицированные домены FN3, специфически связывающиеся с PSMA, дополнительно оценивают на ингибирование активности PSMA, интернализацию, стабильность и другие желаемые характеристики.

Домены FN3 по изобретению, специфически связывающие человеческий PSMA, можно создавать, применяя любой домен FN3 в качестве матрицы для создания библиотеки и проведения скрининга в библиотеке молекул, специфически связывающих человеческий PSMA, с применением предложенных способов. Примеры подходящих для применения доменов FN3 включают в себя 3-й домен FN3 тенасцина С (TN3) (SEQ ID NO: 145), Fibcon (SEQ ID NO: 146) и 10-й домен FN3 фибронектина (FN10) (SEQ ID NO: 147). Применяют стандартные методики клонирования и экспрессии для клонирования библиотек в вектор или синтеза кассет библиотеки с двухцепочечной кДНК, чтобы экспрессировать библиотеки или транслировать их *in vitro*. Например, можно использовать рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997), мРНК-дисплей (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997) или другие бесклеточные системы (патент США № 5643768). Библиотеки вариантов домена FN3 можно экспрессировать как гибридные белки, отображающиеся на поверхности, например, любого приемлемого бактериофага. Хорошо известны способы отображения слитных полипептидов на поверхности бактериофага (патентная публикация США № 2011/0118144; международная патентная публикация № WO 2009/085462; патент США № 6969108; патент США № 6172197; патент США № 5223409; патент США № 6582915; патент США № 6472147).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, основан на последовательности Tencon SEQ ID NO: 1 или последовательности Tencon27 SEQ ID NO: 4, причем SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4 обязательно имеет замены в положениях остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 и/или 86;

Домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, можно модифицировать для улучшения их свойств, например улучшения термостабильности и обратимости термического свертывания и развертывания. Для повышения эффективной термостабильности белков и ферментов использовали ряд способов, включая рациональную конфигурацию, основанную на сравнении с термостабильными последовательностями с высокой степенью сходства, конфигурацию стабилизирующих дисульфидных мостиков, мутации для повышения склонности к образованию альфа-спирали, конструирование солевых мостиков, изменение поверхностного заряда белка, направленную эволюцию и композицию, содержащую консенсусные последовательности (Lehmann and Wyss, Curt Opin Biotechnol, 12, 371-375, 2001). Высокая термостабильность может повышать выход экспрессируемого белка, растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии при изготовлении. Остатки, в которые можно ввести замены для повышения термостабильности Tencon (SEQ ID NO: 1), представляют собой положения остатков 11, 14, 17, 37, 46, 73 или 86, как описано в патентной публикации США № 2011/0274623. Замены, соответствующие этим остаткам, можно вводить в молекулы изобретения, содержащие домены FN3.

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один или разные аспекты целостности белка. Белки чувствительны или "лабильны" к денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменениями осмолярности окружающей среды и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или усили-

ем, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с использованием стандартных способов. Например, стабильность молекулы можно определить путем измерения температуры термического плавления ( $T_m$ ) - температуры в градусах Цельсия ( $^{\circ}\text{C}$ ), при которой половина молекул разворачивается, - с применением стандартных способов. Как правило, чем выше  $T_m$ , тем более стабильной является молекула. Кроме нагрева способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру также можно изменять посредством химической среды.

В одном варианте осуществления домен FN3 по изобретению, специфически связывающийся с человеческим PSMA, может демонстрировать стабильность, повышенную по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или более по сравнению с таким же доменом перед конструированием, измеренную по повышению  $T_m$ .

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. Химические денатурирующие соединения включают гидрохлорид гуанидина, тиоцианат гуанидина, карбамид, ацетон, органические растворители (диметилформамид, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстановители (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитрогиобензол и гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные детергенты, кислоты (например, хлористоводородная кислота (HCl), уксусная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), галогенуксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и специализированные денатурирующие соединения. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на анализе физико-химических свойств, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам, или на разрушении или образовании дисульфидных связей.

Домен FN3 по изобретению можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, таким образом, avidности к связыванию молекулы-мишени или для создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более разные молекулы-мишени. Димеры и мультимеры можно создать путем связывания моноспецифических, би- или мультиспецифических белковых каркасов, например путем включения аминокислотного линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают  $(\text{GS})_2$  (SEQ ID NO: 148),  $(\text{GGGS})_2$  (SEQ ID NO: 149),  $(\text{GGGGS})_5$  (SEQ ID NO: 150),  $(\text{AP})_2$  (SEQ ID NO: 151),  $(\text{AP})_5$  (SEQ ID NO: 152),  $(\text{AP})_{10}$  (SEQ ID NO: 153),  $(\text{AP})_{20}$  (SEQ ID NO: 154) и  $\text{A}(\text{EAAAK})_5\text{AAA}$  (SEQ ID NO: 142). Димеры и мультимеры могут соединяться друг с другом в направлении от N-конца к C-концу. Применение природных и искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды хорошо известно в литературе (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; патент США № 5856456).

#### **Фрагменты, продлевающие период полужизни**

Домен FN3 по изобретению, специфически связывающийся с человеческим PSMA, может включать другие субъединицы, например посредством ковалентного взаимодействия. В одном аспекте изобретения домен FN3 по изобретению дополнительно содержит функциональную группу, увеличивающую период полужизни. Примеры фрагментов, увеличивающих период полужизни, представляют собой альбумин, варианты альбумина, альбуминсвязывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги, а также Fc-области. Пример варианта альбумина представлен в SEQ ID NO: 155. Аминокислотные последовательности человеческих Fc-областей хорошо известны и включают в себя Fc-области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE.

К домену FN3 по изобретению можно присоединить всю константную область антитела или ее часть для придания ему антителоподобных свойств, особенно тех свойств, которые связаны с Fc-областью, например эффекторные функции Fc, такие как связывание с C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, подавление ингибирования рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR), и их можно дополнительно модифицировать путем модификации остатков, которые в Fc отвечают за данные функции (см. обзор в публикации Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20: 685-691, 2009).

В домен FN3 по изобретению можно встроить дополнительные фрагменты, такие как молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), такие как ПЭГ-5000 или ПЭГ-20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с разной длиной цепи, например лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандиовую кислоту, тетрадекандиовую кислоту, октадекандиовую кислоту, докозандиовую кислоту и т.п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для получения необходимых свойств. Данные фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно создавать с помощью стандартных методов клонирования и экспрессии. Альтернативно для прикрепления фрагментов к полученным рекомбинантным способом молекулам настоящего изобретения можно использовать хорошо известные способы химического связывания.

Пегильную функциональную группу можно, например, добавить к домену FN3 по изобретению посредством включения цистеинового остатка в С-конец молекулы или искусственного встраивания цистеинов в положения остатков, обращенных от поверхности молекулы, связывающейся с человеческим PSMA, и присоединения пегильной группы к цистеину с помощью хорошо известных способов.

Домен FN3 по изобретению со встроенными дополнительными фрагментами можно сравнить по функциональности с помощью нескольких хорошо известных анализов. Например, изменение свойств вследствие встраивания доменов Fc и/или вариантов домена Fc можно проанализировать в анализах связывания с рецепторами Fc с использованием растворимых форм рецепторов, таких как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием известных клеточных анализов для измерения, например ADCC или CDC, или оценки фармакокинетических свойств молекул изобретения в моделях *in vivo*.

#### **Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева**

В изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, в виде выделенных полинуклеотидов, или в виде участков экспрессионных векторов, или в виде участков линейных последовательностей ДНК, включая линейные последовательности ДНК, используемые для транскрипции/трансляции *in vitro*, векторов, совместимых с экспрессией, секрецией и/или представлением композиций или результатов их направленного мутагенеза в прокариотах, эукариотах или нитчатых фагах. Некоторые полинуклеотиды описаны в настоящем описании, однако другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют домены FN3 в соответствии с изобретением, также рассматриваются как часть изобретения.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 156, 157, 158 или 159.

Полинуклеотиды изобретения можно получить путем химического синтеза, такого как синтез полинуклеотидов в твердой фазе, на автоматическом синтезаторе полинуклеотидов и сборки в полные одно- или двухцепочечные молекулы. Альтернативно полинуклеотиды изобретения можно получить другими методиками, такими как ПЦР с последующим стандартным клонированием. Методики производства или получения полинуклеотидов с заданной известной последовательностью хорошо известны в данной области.

Полинуклеотиды изобретения могут содержать по меньшей мере одну некодирующую последовательность, такую как промоторная или энхансерная последовательность, интрон, сигнал полиаденилирования, *cis*-последовательность, облегчающую связывание с RepA, и т.п. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, которые кодируют, например, маркерную последовательность или последовательность метки, такой как гистидиновая метка или HA-метка, для облегчения очистки или определения белка, сигнальную последовательность, партнера для гибридного белка, например RepA, Fc или белок оболочки бактериофага, такой как pIX или pIII.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения полинуклеотидов изобретения в данный организм или генетическое окружение каким-либо образом. Такие векторы могут представлять собой экспрессионные векторы, содержащие элементы нуклеотидной последовательности, которые могут контролировать, регулировать, вызывать или допускать экспрессию полипептидов, кодируемых таким вектором. Такие элементы могут содержать сайты связывания энхансера транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, способствующие экспрессии закодированных полипептидов в заданной системе экспрессии. Такие системы экспрессии могут представлять собой клеточные или бесклеточные системы, хорошо известные в данной области.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор в соответствии с изобретением. Домен FN3 по изобретению, специфически связывающийся с человеческим PSMA, можно необязательно получить с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc.,

NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может быть получена от млекопитающего, или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных, иммортализованных или преобразованных упомянутых клеток. Альтернативно клетку-хозяина можно выбрать из видов или организмов, неспособных к гликозилированию полипептидов, например прокариотической клетки или организма, такого как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD (DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), и любого из природных или сконструированных штаммов *E.coli*, *Klebsiella* или *Pseudomonas*.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ получения выделенного домена FN3 по изобретению, специфически связывающегося с человеческим PSMA, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина изобретения в условиях, в которых экспрессируется выделенный домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, и очистку домена FN3.

Домен FN3, специфически связывающийся с человеческим PSMA, можно очистить из рекомбинантных клеточных культур с помощью хорошо известных способов, например путем очистки белком А, осаждением сульфатом аммония или этанолом, кислотной экстракцией, анионной или катионной обменной хроматографией, фосфоцеллюлозной хроматографией, хроматографией с гидрофобным взаимодействием, аффинной хроматографией, гидроксилатитной хроматографией, лектиновой хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

#### **Виды применения доменов FN3 по изобретению, связывающихся с человеческим PSMA**

Домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, можно применять для диагностики, мониторинга, модуляции, лечения, ослабления, предотвращения развития или уменьшения симптомов заболевания человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, текучих сред или хозяина в целом. Способы в соответствии с изобретением можно применять для лечения пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения пациента, имеющего рак, характеризующийся суперэкспрессией PSMA, который включает введение пациенту домена FN3 по изобретению, специфически связывающегося с человеческим PSMA, конъюгированного с цитотоксическим агентом, в течение периода времени, достаточного для лечения пациента.

В некоторых вариантах осуществления раковое заболевание представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого или рак почки.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой расстройство предстательной железы, например рак предстательной железы или доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ДГПЖ).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой светлоклеточный рак почки.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой неоваскулярное расстройство, например рак, характеризующийся ростом солидной опухоли. Примеры видов рака с опухолевыми сосудистыми сетями, характеризующихся суперэкспрессией PSMA и поддающихся лечению в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, светлоклеточный рак почки (CCRCC), колоректальный рак, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак легкого и рак поджелудочной железы (см., например, Vassala et al., *Urology* 70:385.390, 2007 (экспрессия PSMA при CCRCC); Liu et al., *Cancer Res.* 57:3629-3634, 1997 (экспрессия PSMA при различных непростатических раковых заболеваниях, включая рак почки, уротелиальный рак, рак легкого, толстой кишки, молочной железы и аденокарциному печени); и Milowsky et al., *J. Clin. Oncol.* 25:540-547, 2007.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения пациента, имеющего рак предстательной железы, характеризующийся суперэкспрессией PSMA, который включает введение пациенту домена FN3 по изобретению, специфически связывающегося с человеческим PSMA, конъюгированного с цитотоксическим агентом, в течение периода времени, достаточного для лечения пациента.

Пациенты, которым вводят домен FN3 по изобретению, специфически связывающийся с человеческим PSMA, как описано в настоящем описании, включают пациентов с высоким риском развития конкретного расстройства, характеризующегося суперэкспрессией PSMA, а также пациентов с уже существующим таким расстройством. Как правило, у пациента диагностируется наличие расстройства, которое требует лечения. Дополнительно у пациентов в течение курса лечения могут отслеживать какие-либо изменения расстройства (например, усиление или ослабление клинических симптомов расстройства).

При профилактическом применении фармацевтические композиции или лекарственные препараты вводят пациенту, предрасположенному или по другой причине находящемуся в группе риска развития конкретного расстройства, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска или отсрочки начала развития расстройства. При терапевтическом применении композиции или лекарственные препараты вводят пациенту с подозрением, или уже страдающему заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного ослабления симптомов расстройства и его осложнений. Некоторое количество, достаточное для выполнения вышеупомянутого, называется терапевтически эффективной дозой или количеством. Как при профилактической, так и при терапевтической схемах лечения агенты, как правило, вводят в нескольких дозах до достижения достаточного ответа (например, ингибирования патологической ангиогенной активности). Как правило, отслеживают ответ на лечение и, если желаемый ответ начинает ослабевать, вводят повторные дозы.

Для выявления пациентов, подлежащих лечению в соответствии со способами изобретения, могут быть использованы приемлемые способы скрининга, чтобы определить факторы риска, связанные со специфическими расстройствами, или чтобы определить состояние существующего расстройства, выявленного у пациента. Такие способы могут включать в себя, например, определение наличия у пациента родственников, у которых было диагностировано конкретное расстройство. Способы скрининга могут также включать в себя, например, стандартные обследования для определения семейного анамнеза в отношении конкретного расстройства, известного как имеющее наследуемый компонент. Например, известно, что различные раковые заболевания также имеют определенные наследуемые компоненты. Наследуемые компоненты рака включают в себя, например, мутации во множестве генов, которые являются трансформирующими (например, Ras, Raf, EGFR, cMet и другие), наличие или отсутствие конкретных молекул HLA и рецептора подавления цитотоксичности (KIR) или механизмы, посредством которых раковые клетки способны модулировать подавление иммунных клеток, таких как ЕК-клетки и Т-клетки, прямо или опосредованно (см., например, Ljunggren and Malmberg, *Nature Rev. Immunol.* 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, *Clin. Exp. Immunol.* 149:1-8, 2007). Поэтому для выявления пациентов, несущих генетические маркеры, связанные с конкретным интересующим расстройством, обычно могут быть использованы нуклеотидные зонды. Кроме того, в данной области известно множество различных иммунологических способов, которые используются для выявления маркеров конкретного расстройства. Например, доступны и хорошо известны в данной области различные способы иммунологического анализа (ИФА), в которых используются зонды с моноклональными антителами для обнаружения антигенов, связанных с конкретными опухолями. При необходимости может быть выполнен скрининг по известной симптомологии пациента, возрастным факторам, связанным факторам риска и т.п. Эти способы позволяют клиницисту регулярно отбирать пациентов, требующих лечения способами, описанными в настоящем описании. В соответствии с этими способами в качестве независимой программы лечения или в качестве последующей, вспомогательной или координирующей схемы лечения по отношению к другим способам лечения может быть выполнено нацеливание на патологические клетки, экспрессирующие PSMA.

В некоторых описанных в настоящем описании способах домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, конъюгированные с цитотоксическим агентом, могут быть использованы для лечения пациента с раком предстательной железы в комбинации со вторым терапевтическим средством.

В некоторых описанных в настоящем описании способах домены FN3 по изобретению, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, конъюгированные с цитотоксическим агентом, могут быть использованы для лечения пациента, у которого имеется или развилась резистентность к лечению вторым терапевтическим средством.

Второе терапевтическое средство может представлять собой лекарственное средство, одобренное для лечения рака предстательной железы, такое как абиратерона ацетат (зитига), бикалутамид, кабазитаксел, касодекс (бикалутамид), дегареликс, доцетаксел, энзалутамид, гозерелина ацетат, джевтана (кабазитаксел), лейпролида ацетат, люпрон (лейпролида ацетат), люпрон-депо (лейпролида ацетат), люпрон-депо на 3 месяца (лейпролида ацетат), люпрон-депо на 4 месяца (лейпролида ацетат), люпрон-депо педиадрический (лейпролида ацетат), митоксантрона гидрохлорид, преднизон, провендж (сипулейцел-Т), ди-хлорид радия-223, сипулейцел-Т, таксотер (доцетаксел), виадур (лейпролида ацетат), ксофиги (дихлорид радия-223), кстанди (энзалутамид) или золадекс (гозерелина ацетат) (источник: Национальный институт раковых заболеваний).

Для определения того, имеет ли пациент резистентность, приобретенную резистентность или предрасположенность к приобретению резистентности к лечению, можно использовать различные качественные и/или количественные способы. Симптомы, которые могут быть связаны с резистентностью, включают, например, ухудшение или отсутствие улучшения состояния здоровья пациента, увеличение размера опухоли, прекращение или замедление торможения роста опухоли и/или распространение раковых клеток в организме из одного места к другим органам, тканям или клеткам. Показателем того, что у пациента развилась резистентность или имеется предрасположенность к развитию резистентности к лечению, также может быть повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных с раком,

таких как анорексия, когнитивные расстройства, депрессия, одышка, утомляемость, гормональные нарушения, нейтропения, боль, периферическая нейропатия и половая дисфункция. Симптомы, связанные с раковым заболеванием, могут варьировать в зависимости от типа ракового заболевания. Например, симптомы, связанные с раком предстательной железы, могут включать затрудненное мочеиспускание или частые позывы к мочеиспусканию, болезненное мочеиспускание, кровь в моче или сперме, ноющую боль в тазе, спине и/или бедрах. Симптомы, связанные с раком легких, могут включать устойчивый кашель, откашливание крови, нехватку дыхания, дыхание с присвистом и болью в груди, потерю аппетита, потерю массы тела без стремления к похудению и утомляемость. Специалист-онколог может легко идентифицировать симптомы, связанные с конкретным типом рака.

Термины "лечить" или "лечение" обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например развития или распространения рака. Для целей настоящего изобретения преимущественные или желательные клинические результаты включают, без ограничений, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию состояния (т.е. отсутствие ухудшения), задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное улучшение состояния и ремиссию (полную или частичную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" также может обозначать продление выживаемости по сравнению с ожидаемым сроком жизни при отсутствии лечения. Требуемые лечения пациенты включают тех, которые уже имеют состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у которых состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество домена FN3 по изобретению, связывающегося с PSMA, может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела пациента, а также способности домена FN3 по изобретению, связывающегося с PSMA, вызывать желательный ответ у пациента. Примеры показателей эффективности домена FN3, связывающегося с PSMA, которые могут снижаться или ослабевать при резистентности, включают, например, улучшение состояния здоровья пациента, уменьшение или сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие места в теле.

#### **Введение/фармацевтические композиции**

В изобретении предложены фармацевтические композиции, которые содержат домены FN3, специфически связывающиеся с человеческим PSMA, необязательно конъюгированные со второй молекулой изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможно получение доменов FN3 по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена или молекулы в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят активное соединение. Такой носитель может быть жидким, таким как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4% солевой раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как агенты, необходимые для регулирования уровня pH, буферные агенты, стабилизаторы, загустители, смазочные вещества и красители и т.п. Концентрация молекул по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьироваться в широких пределах, т.е. от менее чем около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20 мас.%, и выбирается преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включая другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности, pp. 958-989.

Способ введения для терапевтического применения доменов FN3 по изобретению может представлять собой любой приемлемый путь, обеспечивающий доставку агента хозяину, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, легочное; чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) с применением состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, корпускулы; и содержащиеся в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе; или же с помощью других средств, очевидных для квалифицированного специалиста, которые хорошо известны в данной области. Локализованное введение можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, в хрящ, полость, клетку, мозжечок, желудочек мозга, толстую киш-

ку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильной буферной воды и от около 1 нг до около 100 мг, например от около 50 нг до около 30 мг или более предпочтительно - от около 5 до около 25 мг домена FN3 по изобретению.

Домены FN3 по изобретению можно вводить пациенту любым приемлемым способом, например парентерально путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или интраперитонеально. Внутривенную инфузию можно проводить в течение лишь 15 мин, но чаще в течение 30, 60, 90 мин или даже 2 или 3 ч. Связывающиеся с PSMA домены FN3 по изобретению также можно вводить непосредственно в место локализации заболевания (например, в саму опухоль). Доза, вводимая пациенту, имеющему рак, достаточна для того, чтобы ослаблять или по меньшей мере частично затормозить подвергаемое лечению заболевание ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Также можно обеспечивать фиксированную единичную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может зависеть от площади поверхности тела пациента, например составлять 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м<sup>2</sup>. Для лечения рака обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 10, 12, 20 или более доз. Введение доменов FN3 по изобретению можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе.

Например, фармацевтическую композицию, содержащую домены FN3 по изобретению, для введения пациенту с массой тела 80 кг путем внутривенной инфузии, можно приготовить таким образом, чтобы она содержала около 200 мл стерильного раствора Рингера и от около 8 до около 2400 мг, от около 400 до около 1600 мг или от около 400 до около 800 мг доменов FN3, связывающихся с PSMA. Способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в публикации Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Домены FN3 по изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в соответствующем носителе перед применением. Было показано, что данная методика эффективна для стандартных белковых препаратов, при этом можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления.

Домены FN3 по изобретению можно вводить пациенту одной дозой или же введения могут быть повторными, например через одни сутки, двое суток, трое суток, пятеро суток, шестеро суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца или три месяца. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Введение можно повторять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более.

Домены FN3 по изобретению можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или отдельно.

Домен FN3 по изобретению, необязательно в комбинации со вторым терапевтическим агентом, можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включая внешнее направленное излучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), а также любой формой радиохирургии, включая гамма-нож, кибер-нож, Linac и внутритканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GlinSite), и/или хирургическим лечением.

Если рассматривать конкретно лечение солидных опухолей, протоколы оценки измеряемых конечных точек и противоопухолевой активности являются хорошо известными в данной области. Хотя в каждом протоколе оценки ответа на лечение опухоли могут быть определены отличным образом, критерии RECIST (критерии оценки ответа на лечение солидных опухолей) в настоящее время являются руководящими указаниями по оценке ответа опухоли на лечение, рекомендованными Национальным институтом раковых заболеваний (см. Therasse et al., J. Natl. Cancer Inst. 92: 205-216, 2000). Согласно критериям RECIST ответ опухоли на лечение означает уменьшение или устранение всех поддающихся измерению поражений или метастазов. Заболевание по существу расценивается как поддающееся измерению, если оно содержит поражения, по меньшей мере один из размеров которых при точном измерении составляет  $\geq 20$  мм при использовании стандартных способов или  $\geq 10$  мм при использовании спирального КТ-сканирования с четко определенными границами по медицинскому снимку или рентгенограмме, компьютерной осевой томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) или клинического обследования (в случае поверхностных поражений). Заболевание, не поддающееся измерению, означают, что заболевание содержит поражения размером  $< 20$  мм при использовании стандартных способов измерения

или < 10 мм при использовании спирального КТ-сканирования и истинные поражения, не поддающиеся измерению (слишком малые для точного измерения). Заболевания, не поддающиеся измерению, включают плевральные экссудаты, асциты и заболевание, задокументированное по косвенным признакам.

Критерии оценки объективного статуса необходимы для протоколов, чтобы оценить ответ солидной опухоли на лечение. Типичные критерии включают в себя следующее: (1) полный ответ (ПО), определяемый как полное исчезновение всех поддающихся измерению заболеваний; отсутствие новых поражений; отсутствие связанных с заболеванием симптомов; отсутствие признаков не поддающегося измерению заболевания; (2) частичный ответ (ЧО), определяемый как уменьшение в общей сложности на 30% наиболее длинного диаметра целевых поражений; (3) прогрессирующее заболевание (ПЗ), определяемое как увеличение в общей сложности на 20% наиболее длинного диаметра целевых поражений или появление любого нового поражения; (4) стабильное состояние или отсутствие ответа, определяемое как невозможность отнесения к категории ПО, ЧО или прогрессирующего заболевания. (См. Therasse et al., выше.).

Дополнительные измеряемые конечные точки, которые допускаются в онкологии, включают общую выживаемость (ОВ), безрецидивную выживаемость (БРВ), частоту объективного ответа (ЧОО), время до прогрессирования (ВДП) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) (см. Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, Md.)

Фармацевтические композиции могут поставляться в виде набора, содержащего контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании. Фармацевтическая композиция может быть предложена, например, в форме раствора для инъекций на одну или несколько доз или в виде стерильного порошка, который разводят перед инъекцией. В альтернативном варианте осуществления такой набор может включать диспенсер сухого порошка, генератор жидкого аэрозоля или небулайзер для введения фармацевтической композиции. Такой набор может дополнительно содержать письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты осуществления изобретения будут дополнительно описаны в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

#### Реагенты и конструкторы

Внеклеточные домены PSMA яванского макака (учетный номер в базе данных белков яванского макака EHH56646.1, SEQ ID NO: 32) и шимпанзе (учетный номер в базе данных Uniprot H2Q3K5, SEQ ID NO: 33) клонировали в экспрессионный вектор pUnder вместе с метками 6His и Avi. Белки временно экспрессировали в клетках 293НЕК-ехр1. Супернатанты собирали и очищали путем центрифугирования. Белки очищали с использованием двухэтапного способа очистки: 1) очистка IMAC с использованием колонки HisTrap HP и 2) эксклюзионная очистка по размеру (Superdex 200), при которой буферный раствор для элюирования представляет собой DPBS, содержащий  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и 0,5 mM  $ZnCl_2$  для стабилизации димеризации PSMA. Фракции, содержащие интересующий белок, объединяли и определяли концентрацию белка посредством A280.

Ген, кодирующий сортазу A S. aureus, создавали с помощью вектора DNA2.0 и субклонировали в вектор rJexpress401 (DNA2.0) для экспрессии под управлением промотора T5. Конструкт с сортазой для экспрессии растворимого белка отсутствует в N-концевом домене природного белка, состоящего из 25 аминокислот, так как этот домен ассоциирован с мембраной (Ton-That et al., Proc Natl Acad Sci USA 96:12424-12429, 1999). Сортазу экспрессировали в виде N-концевой метки His6 (НННННН, SEQ ID NO: 34) с последующим сайтом протеазы TEV для удаления метки (ENLYFQS, SEQ ID NO: 54), что приводило к получению сортазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. Используемый белок сортазы также включает в себя 5 последовательностей мутаций, которые согласно литературным данным увеличивают каталитическую эффективность фермента по сравнению с белками дикого типа (SEQ ID NO: 53) (Chen et al., Proc Natl Acad Sci USA 108:11399-11404, 2011). Плазмиду трансформировали в клетки E.coli BL21 Gold (Agilent Technologies) для экспрессии. Одну колонию отбирали и выращивали в бульоне Luria Broth (Teknova), обогащенном канамицином, и инкубировали 18 ч при 37°C и 250 об/мин. 250 мл бульона Terrific Broth (Teknova), обогащенного канамицином, засеивали этими субкультурами и выращивали их при 37°C в течение 4 ч с перемешиванием. Экспрессию белка индуцировали с помощью 1 mM IPTG и белок экспрессировали в течение 18 ч при 30°C. Клетки собирали путем центрифугирования при ускорении 6000 g и хранили при температуре -20°C до очистки. Замороженный клеточный осадок размораживали в течение 30 мин при комнатной температуре и суспендировали в реагенте для экстракции белков BugBusterHT (EMD Millipore), обогащенном 1 мкл рекомбинантного лизоцима (EMD Millipore) на 30 мл, в соотношении 5 мл на грамм клеточной пасты и инкубировали в течение 30 мин на шейкере при комнатной температуре. Лизат очищали путем центрифугирования при ускорении 74600 g в течение 30 мин.

Супернатант наносили на гравитационную колонку, заполненную 3 мл смолы Qiagen Superflow Ni-NTA, предварительно кондиционированную буферным раствором А (50 mM натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7,0, содержащий 0,5 M NaCl и 10 mM имидазола). После загрузки колонку промывали

100 мл буферного раствора А. Белок элюировали буферным раствором А, обогащенным 250 мМ имидазола, и загружали на препаративную гель-фильтрационную колонку, TSK Gel G3000SW 21,5×600 мм (Tosoh), уравновешенную в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (Gibco). Гель-фильтрационную хроматографию выполняли при комнатной температуре в PBS со скоростью потока 10 мл/мин, используя хроматографическую систему АКТА-AVANT. Затем очищенную сортазу расщепляли протеазой TEV для удаления метки His6. 28 мг сортазы инкубировали в 10 мл с 3000 единицами протеазы AcTEV (Invitrogen) в поставляемом буферном растворе, обогащенном 1 мМ DTT, в течение 2 ч при 30°C. Сортазу без метки очищали с помощью смолы Ni-NTA. Выполняли замену буферного раствора реакционной смеси на TBS (50 мМ трис с pH 7,5, 150 мМ NaCl) с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare) и реакционную смесь наносили на гравитационную колонку, заполненную 0,5 мл смолы Qiagen Superflow Ni-NTA, предварительно уравновешенную буферным раствором А. Элюент собирали, а смолу промывали 3 мл буферного раствора А, который добавляли к элюенту. Элюент концентрировали до ~0,5 мл в концентраторе Amicon 15 с пределом пропускания 10 кДа (EMD Millipore). Добавляли дополнительное количество буферного раствора TBS и образец концентрировали снова (повторяли дважды) для замены буферного раствора на TBS. Добавляли 1/3 объема 40%-го глицерина (конечная концентрация глицерина: 10%) и сортазу хранили при -20°C в случае краткосрочного хранения или при -80°C в случае долгосрочного хранения.

Пример 1. Создание библиотек Tenson с рандомизированными петлями

Tenson (SEQ ID NO: 1) представляет собой каркасный иммуноглобулин-подобный домен фибронектина типа III (FN3), разработанный на основе консенсусной последовательности пятнадцати доменов FN3 тенасцина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патент США № 8278419). На кристаллической структуре Tenson выявляются шесть поверхностных петель, соединяющих семь бета-тяжей. Данные петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно подвергать рандомизации с созданием библиотеки доменов фибронектина типа III (FN3), которые можно использовать для выбора новых молекул, связывающихся с конкретными мишенями.

Tenson: LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAINLTPGERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO 1):

Различные библиотеки получали с помощью каркаса tenson и различных стратегий конструирования. В целом библиотеки TCL1 и TCL2 производили хорошие связующие вещества. Создание библиотек TCL1 и TCL2 подробно описано в международной патентной публикации № WO 2014081944A2.

#### Создание библиотеки TCL1

Библиотека, разработанная с рандомизацией только петли FG в Tenson (SEQ ID NO: 1), TCL1, была создана для применения с *cis*-дисплейной системой (Jacobs et al., Protein Engineering, Design and Selection, 25:107-117, 2012). В этой системе создается одноцепочечная ДНК, в которую включены последовательности для промотора Tac, кодовая последовательность библиотеки Tenson, кодовая последовательность RepA, *cis*-элемент и *ori*-элемент. При экспрессии в системе транскрипции/трансляции *in vitro* формируется комплекс гибридного белка Tenson-RepA, связанный в *cis* с ДНК, которая его кодирует. Затем комплексы, связывающиеся с молекулой-мишенью, выделяют и амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано ниже.

Конструирование библиотеки TCL1 для применения с *cis*-дисплеем осуществляли путем последовательных циклов ПЦР с получением конечных линейных двухцепочечных молекул ДНК из двух половин; фрагмент 2 м (5') содержит последовательности промотора и Tenson, а фрагмент 1 м (3') содержит ген *repA* и элементы *cis* и *ori*. Эти две половины объединяют рестриктазным фрагментом, чтобы получить полный конструктор. Библиотека TCL1 была разработана с возможностью включения случайных аминокислот только в петлю FG в Tenson, KGGHRSN (SEQ ID NO: 55). При создании данной библиотеки использовали NNS-кодоны, что позволило встраивать в петлю FG все 20 аминокислот и один стоп-кодон. Библиотека TCL1 содержит шесть отдельных подбиблиотек, каждая из которых имеет разную рандомизированную длину петли FG, от 7 до 12 остатков, для дополнительного увеличения разнообразия.

Библиотека TCL1 (SEQ ID NO: 2)

LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAINLTPGERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX<sub>7-12</sub>PLSAEFTT;

где X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> представляют собой любую аминокислоту и

X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> и X<sub>12</sub> представляют собой любую аминокислоту или удалены.

#### Создание библиотеки TCL2

Была создана библиотека TCL2, в которой в Tenson были рандомизированы как петля BC, так и петля FG, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В табл. 3 представлено распределение аминокислот в желаемых положениях петель в библиотеке TCL2. Разработанное распределение аминокислот имело две цели. Во-первых, библиотека была ориентирована на остатки, которые по прогнозу являются структурно значимыми для сворачивания и стабильности Tenson на основании анализа кристаллической структуры Tenson и/или гомологического моделирования. Например, положение 29 было предназначено только для подмножества гидрофобных аминокислот, так как этот

остаток погружен в гидрофобную сердцевину свернутого Tencon. Второй уровень разработки включал в себя смещение распределения аминокислот к распределению остатков, которые предпочтительно находятся в тяжелой цепи HCDR3 антител, для эффективного получения соединений с высокой аффинностью связывания (Birtalan et al., J Mol Biol 377:1518-28, 2008; Olson et al., Protein Sci 16:476-84, 2007). Таким образом, "разработанное распределение" из табл. 2 относится к представленному ниже распределению: 6% аланина, 6% аргинина, 3,9% аспарагина, 7,5% аспарагиновой кислоты, 2,5% глутаминовой кислоты, 1,5% глутамина, 15% глицина, 2,3% гистидина, 2,5% изолейцина, 5% лейцина, 1,5% лизина, 2,5% фенилаланина, 4% пролина, 10% серина, 4,5% треонина, 4% триптофана, 17,3% тирозина и 4% валина. В данном распределении отсутствуют метионин, цистеин и СТОП-кодоны.

Библиотека TCL2 (SEQ ID NO: 3)

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>SFLIQYQESEKVGGEAINLTPGSR

SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>SX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>LSAEFTT; где

X<sub>1</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>2</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>3</sub> - это Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>4</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>5</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>6</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>7</sub> представляет собой Phe, Ile, Leu, Val или Tyr;

X<sub>8</sub> представляет собой Asp, Glu или Thr;

X<sub>9</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>10</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>11</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>12</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>13</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>14</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val и

X<sub>15</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val.

Таблица 2

Положение остатка *	Остатки дикого типа	Распределение в библиотеке TCL2
22	T	Разработанное распределение
23	A	Разработанное распределение
24	R	50% R+разработанное распределение
25	D	Разработанное распределение
26	A	20% A+20% G+разработанное распределение
27	A	Разработанное распределение
28	F	20% F, 20% I, 20% L, 20% V, 20% Y
29	D	33% D, 33% E, 33% T
75	K	Разработанное распределение
76	G	Разработанное распределение
77	G	Разработанное распределение
78	H	Разработанное распределение
79	R	Разработанное распределение
80	S	100% S
81	N	Разработанное распределение
82	R	50% R+разработанное распределение

\*нумерация остатков основана на последовательности Tencon SEQ ID NO: 1

Впоследствии эти библиотеки были улучшены различными способами, включая построение биб-

лиотек на стабилизированном каркасе Tencon (патент США № 8569227), в который введены замены E11R/L17A/N46V/E86I (Tencon27; SEQ ID NO: 4) по сравнению с tencon дикого типа, а также изменение положений, рандомизированных в петлях BC и FG. Описание Tencon27 представлено в международной заявке на патент № WO 2013049275. Затем были разработаны новые библиотеки, выполненные с возможностью рандомизации только петли FG Tencon (библиотека TCL9) или комбинации петель BC и FG (библиотека TCL7). Такие библиотеки были сконструированы для применения с cis-дисплейной системой (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:2806-2810, 2004). Подробная информация о данной конфигурации приведена ниже.

Стабилизированный Tencon (Tencon27) (SEQ ID NO: 4) LPAPKNLWSRVTEDSARLSW-TAPDAAAFDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTTTCL7 (рандомизированные петли FG и BC) (SEQ ID NO: 5) LPAPKNLWSRVTEDSARLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>FDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>SNPLSAIFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub> и X<sub>16</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y и

X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>18</sub> и X<sub>19</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или удалены.

TCL9 (рандомизированная петля FG) (SEQ ID NO: 6) LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAAFDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>SNPLSAIFTT;

где X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> и X<sub>7</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и

X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> и X<sub>12</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или удалены.

Для конструирования библиотеки фрагменты ДНК, кодирующие рандомизированные петли BC (длины 6-9 положений) или петель FG (длины 7-12 положений), синтезировали с использованием технологии Slonomics (Sloning Biotechnology GmbH), чтобы управлять распределением аминокислот библиотеки и удалить стоп-кодоны. Два различных набора молекул ДНК, рандомизирующих либо петлю BC, либо петли FG, синтезировали независимо и впоследствии объединяли с помощью ПЦР для создания полного продукта библиотеки.

#### Конструирование библиотек петли FG (TCL9)

Создавали набор синтетических молекул ДНК, состоящих из промотора 2 м (5') Тас и последующей полной последовательности гена Tencon за исключением рандомизированных кодонов в петле FG (SEQ ID NO: 26-31). Для рандомизации петли FG все аминокислоты, за исключением цистеина и метионина, кодировали с равными процентными отношениями. Длины диверсифицированного участка таковы, что они кодируют 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот в петле FG. Подбиблиотеки каждого варианта длины синтезировали индивидуально в количестве 2 мкг, а затем амплифицировали посредством ПЦР с использованием олигонуклеотидов Sloning-FOR (SEQ ID NO: 9) и Sloning-Rev (SEQ ID NO: 10).

Фрагмент 1 м (3') библиотеки представляет собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая сайт рестрикции PspOMI, кодирующую область гена герА и cis- и ori-элементы. ПЦР проводили для амплификации этого фрагмента с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen) в качестве матрицы с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные ПЦР-продукты расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования участка 2 м (5') библиотечной ДНК с фрагментом ДНК 1 м (3'), содержащим ген герА, 2 пмоль (от ~ 540 до 560 нг) фрагмента ДНК 2 м (5') лигировали с эквимольным количеством (~ 1,25 мкг) фрагмента герА ДНК 1 м (3') в присутствии ферментов NotI и PspOMI и лигазы T4 при 37°C в течение ночи. Лигированный библиотечный продукт амплифицировали, выполнив 12 циклов ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2250 (SEQ ID NO: 11) и DigLigRev (SEQ ID NO: 12). Для каждой подбиблиотеки полученные ДНК из 12 ПЦР объединяли и очищали с помощью спин-колонки Qiagen. Выход для каждой подбиблиотеки TCL9 находился в диапазоне 32-34 мкг.

#### Конструирование библиотек петли FG/BC (TCL7)

Библиотека TCL7 представляет собой библиотеку с рандомизированными петлями BC и FG Tencon. В данной библиотеке петли BC длиной 6-9 аминокислот комбинаторно смешивали с рандомизированными петлями FG длиной 7-12 аминокислот. Создавали синтетические фрагменты Tencon BC6, BC7, BC8 и BC9 (SEQ ID NO: 13-16), включающие ген Tencon, кодирующий N-концевой участок белка до и включая остаток VX таким образом, что петля BC замещена 6, 7, 8 или 9 рандомизированными аминокислотами. Эти фрагменты синтезировали до обнаружения мутаций L17A, N46V и E83I (CEN5243), но эти мутации были внедрены на молекулярно-биологических стадиях, описанных ниже. Для комбинирования этого фрагмента с фрагментами, кодирующими рандомизированные петли FG, выполнили следующие стадии.

Сначала создавали фрагмент ДНК, кодирующий промотор Tac и последовательность 2 m (5') Tenson до нуклеотида, кодирующего аминокислоту A17 (130mer-L17A, SEQ ID NO: 17), посредством ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222ext (SEQ ID NO: 18) и LS1114 (SEQ ID NO: 19). Это делали для включения мутации L17A в библиотеку (CEN5243). Затем фрагменты ДНК, кодирующие остатки R18-V75 Tenson, включая рандомизированные петли BC, амплифицировали посредством ПЦР с использованием BC6, BC7, BC8 или BC9 в качестве матрицы и олигонуклеотидов LS1115 (SEQ ID NO: 20) и LS1117 (SEQ ID NO: 21). На этой стадии ПЦР происходило присоединение сайта BsaI к концу 1 m (3'). Эти фрагменты ДНК впоследствии соединяли посредством ПЦР с перекрывающимися праймерами с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов POP2222ext и LS1117. Полученный продукт ПЦР размером 240 п.н. объединяли и очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР Qiagen. Очищенную ДНК расщепляли с помощью BsaI-HF и очищали на геле.

Фрагменты, кодирующие петлю FG, амплифицировали посредством ПЦР с использованием FG7, FG8, FG9, FG10, FG11 и FG12 в качестве матриц с олигонуклеотидами SDG10 (SEQ ID NO: 22) и SDG24 (SEQ ID NO: 23) для включения сайта рестрикции BsaI и вариантов N46V и E86I (CEN5243).

Расщепленные фрагменты BC и фрагменты FG лигировали вместе за одну стадию с использованием тройного лигирования. Выполняли четыре реакции лигирования в 16 возможных комбинациях, при этом в каждой реакции лигирования комбинировали две петли BC различной длины и 2 петли FG различной длины. Каждый пул лигирования содержал ~ 300 нг совокупного фрагмента BC и 300 нг фрагмента FG. Впоследствии 4 пула лигирования амплифицировали посредством ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222 (SEQ ID NO: 24) и SDG28 (SEQ ID NO: 25). Впоследствии 7,5 мкг каждого продукта реакции расщепляли NotI и очищали с использованием колонки для очистки продуктов ПЦР Qiagen. 5,2 мкг этой ДНК лигировали с эквимольным количеством фрагмента RepA ДНК (~14 мкг), расщепленным PspOMI, и продукт амплифицировали посредством ПЦР с использованием олигонуклеотидов POP2222.

Пример 2. Создание библиотек Tenson, имеющих альтернативные поверхности связывания

Выбор остатков для рандомизации в конфигурации конкретной библиотеки определяет общую форму созданной поверхности взаимодействия. Рентгеновский кристаллографический анализ содержащего домен FN3 каркасного белка, выбранного для связывания связывающего мальтозу белка (MBP) из библиотеки с рандомизированными петлями BC, DE и FG, показал наличие значительно искривленной поверхности взаимодействия, соответствующей активному сайту MBP (Koide et al., Proc Natl Acad Sci USA, 104:6632-6637, 2007). Напротив, было обнаружено, что у каркасного белка на основе повтора анкирина, выбранного для связывания с MBP, была значительно более плоская поверхность взаимодействия, при этом он связывался с внешней поверхностью MBP, которая удалена от активного (Binz et al., Nat Biotechnol, 22: 575-582, 2004). Эти результаты свидетельствуют о том, что форма связывающей поверхности молекулы каркаса (криволинейная или плоская) может определять, какие белки-мишени или конкретные эпитопы на этих белках-мишенях могут быть эффективно связаны каркасом. Опубликованные попытки по конструированию содержащих домены FN3 белковых каркасов для связывания белка опирались на конструирование смежных петель для связывания мишени, таким образом позволяя получить криволинейные поверхности связывания. Этот подход может ограничивать число мишеней и эпитопов, доступных для таких каркасов.

Tenson и другие домены FN3 содержат два набора CDR-подобных петель, лежащих на противоположных сторонах молекулы, причем первый набор образован петлями BC, DE и FG, а второй набор образован петлями AB, CD и EF. Два набора петель разделены бета-тяжами, которые образуют центр структуры FN3. При повороте изображения Tenson на 90 градусов можно визуализировать альтернативную поверхность. Эта несколько вогнутая поверхность образована петлями CD и FG и двумя антипараллельными бета-тяжами C и F и в настоящем описании называется поверхностью C-CD-F-FG. Поверхность C-CD-F-FG можно использовать в качестве шаблона для разработки библиотек поверхностей взаимодействия белкового каркаса посредством рандомизации подмножества остатков, образующих поверхность. Бета-тяжи имеют повторяющуюся структуру, в которой боковая цепь каждого второго остатка открыта на поверхности белка. Таким образом, библиотеку можно получить путем рандомизации некоторых или всех открытых на поверхности остатков бета-тяжей. Путем выбора соответствующих остатков в бета-тяжах можно получить уникальную поверхность каркаса для взаимодействия с другими белками при минимальной потере присущей каркасу Tenson стабильности.

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO: 7) была разработана в каркасе Tenson27 (SEQ ID NO: 4).

Полное описание способов, применяемых для разработки этой библиотеки, приведено в публикации патента США № US 2013/0226834.

Библиотека TCL14 (SEQ ID NO: 7): LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAP-DAAFDSEFX<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>EX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>GEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX<sub>8</sub>VX<sub>9</sub>IX<sub>10</sub>GVKGGX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>SX<sub>13</sub>PLS AIFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub> и X<sub>13</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P,

Q, R, S, T, V, W, Y, C или M.

Два бета-тяжа, образующие поверхность C-CD-F-FG в Tenson27, имеют в совокупности 9 открытых на поверхности остатков, которые можно рандомизировать; тяж C: S30, L32, Q34, Q36; тяж F: E66, T68, S70, Y72 и V74, тогда как петля CD имеет 6 потенциальных остатков: S38, E39, K40, V41, G42 и E43, а петля FG имеет 7 потенциальных остатков: K75, G76, G77, H78, R79, S80 и N81. В конфигурацию TCL14 для включения избрали только выбранные остатки вследствие большего теоретического размера библиотеки при рандомизации всех 22 остатков.

Тринадцать положений в Tenson выбрали для рандомизации: L32, Q34 и Q36 в тяже C, S38, E39, K40 и V41 в петле CD, T68, S70 и Y72 в тяже F, H78, R79 и N81 в петле FG. В тяжах C и F не рандомизировали S30 и E66, поскольку они находятся непосредственно за петлями CD и FG и не являются явным образом частью поверхности C-CD-F-FG. В петле CD не рандомизировали G42 и E43, поскольку глицин, обеспечивающий гибкость, может быть ценным в областях петли, а E43 расположен в точке соединения с поверхностью. В петле FG исключили K75, G76, G77 и S80. Глицины исключили по вышеуказанным причинам, в то время как тщательное исследование кристаллических структур показало, что S80 образует ключевые контакты с ядром и помогает образовать стабильную петлю FG. K75 обращен от поверхности C-CD-F-FG и был менее привлекательным кандидатом для рандомизации. Хотя вышеуказанные остатки не были рандомизированы в исходной конфигурации TCL14, их можно было включить в последующие конфигурации библиотеки для обеспечения дополнительного разнообразия для выбора *de novo* или, например, для библиотеки повышения аффинности на основе выбранного конкретного варианта мишени для TCL14.

После создания TCL14 были созданы 3 дополнительные библиотеки Tenson аналогичной конфигурации. Эти две библиотеки, TCL19, TCL21 и TCL23, рандомизированы в тех же положениях, что и TCL14 (см. выше), однако распределение аминокислот, появляющихся в этих положениях, изменено (табл. 3). TCL19 и TCL21 были разработаны таким образом, что включают равное распределение 18 природных аминокислот в каждом положении (5,55% для каждой), за исключением только цистеина и метионина. TCL23 был разработан таким образом, что каждое рандомизированное положение примерно соответствует распределению аминокислот, обнаруженному в петлях HCDR3 функциональных антител (Birtalan et al., J Mol Biol 377:1518-1528, 2008), как представлено в табл. 3. Как и в библиотеке TCL21, цистеин и метионин были исключены.

Третья дополнительная библиотека была построена для расширения потенциальной поверхности связывания мишени других библиотек библиотеки. В данной библиотеке (TCL24) были рандомизированы 4 дополнительных положения Tenson по сравнению с библиотеками TCL14, TCL19, TCL21 и TCL23. Эти положения включают N46 и T48 из D-тяжа и S84 и 186 из G-тяжа. Положения 46, 48, 84 и 86 были выбраны, в частности, в связи с тем, что поверхности боковых цепей этих остатков не соприкасаются с бета-тяжами D и G и располагаются структурно смежно с рандомизированными участками тяжей C и F, в результате увеличивая площадь поверхности, доступную для связывания с белками-мишенями. Распределение аминокислот, используемых в каждом положении, для TCL24 идентично таковому, описанному для TCL19 и TCL21 в табл. 3.

Библиотека TCL24 (SEQ ID NO: 8): LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAP-DAAAFDSFX<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>EX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>GEAIX<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>VPGSERSYDLTGLKPGTEYX<sub>10</sub>VX<sub>11</sub>IX<sub>12</sub>GVKGGX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SX<sub>15</sub>P LX<sub>16</sub>AX<sub>17</sub>FTT;

где X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> и X<sub>17</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, Y или W.

Таблица 3. Частота встречаемости аминокислот (%) в каждом рандомизированном положении для TCL21, TCL23 и TCL24

Аминокислота	TCL19	TCL21	TCL23	TCL24
Ala	5,6	5,6	6,0	5,6
Arg	5,6	5,6	6,0	5,6
Asn	5,6	5,6	3,9	5,6
Asp	5,6	5,6	7,5	5,6
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0
Gln	5,6	5,6	1,5	5,6
Glu	5,6	5,6	2,5	5,6
Gly	5,6	5,6	15,0	5,6
His	5,6	5,6	2,3	5,6
Ile	5,6	5,6	2,5	5,6
Leu	5,6	5,6	5,0	5,6
Lys	5,6	5,6	1,5	5,6
Met	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	5,6	5,6	2,5	5,6
Pro	5,6	5,6	4,0	5,6
Ser	5,6	5,6	10,0	5,6
Thr	5,6	5,6	4,5	5,6
Trp	5,6	5,6	4,0	5,6
Tyr	5,6	5,6	17,3	5,6
Val	5,6	5,6	4,0	5,6

#### Создание библиотек TCL21, TCL23 и TCL24

Библиотеку TCL21 создавали с использованием технологии конструирования библиотек Colibra (Isogenica), чтобы управлять распределением аминокислот. Фрагменты гена TCL19, TCL23 и TCL24 создавали с использованием технологии Slonomics (Morphosys) для управления распределением аминокислот. ПЦР использовали для амплификации каждой библиотеки после начального синтеза с последующим лигированием с геном RepA, чтобы использовать в селекциях с использованием системы CIS-дисплея (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101: 2806-2810, 2004), как описано выше для библиотек петель.

Пример 3. Отбор доменов фибронектина типа III (FN3), которые связываются с PSMA.

Отбор на планшетах.

Для выбора PSMA-связывающих центринов из библиотек TCL7, TCL9, TCL19 и TCL21 применяли CIS-дисплей. Для выполнения транскрипции и трансляции *in vitro* (ИТТ) 3 мкг библиотеки ДНК инкубировали при 30°C с 0,1 мМ полными аминокислотами, предварительно смешанными компонентами S30 1X и 15 мкл экстракта S30 (Promega) в общем объеме, равном 50 мкл. Через 1 ч добавляли 375 мкл блокирующего раствора (1× TBS pH 7,4, 0,01% I-block (Life Technologies, № T2015), 100 мкг/мл ДНК молока сельди) и реакционные смеси инкубировали на ледяной бане в течение 15 мин. Реакционные смеси ИТТ инкубировали с рекомбинантными белками: PSMA шимпанзе (ячейка 229) или яванского макака (ячейка 230) или гибридным белком PSMA-Fc яванского макака (ячейка 231), которые иммобилизовали на 96-луночных планшетах Maxisorb, покрытых антителами к человеческому PSMA (Lifespan Bioscience, каталожный № LC-C150527). Несвязанные элементы библиотеки удаляли путем последовательных промывок с использованием TBST и TBS. После промывки ДНК элюировали из белка-мишени путем нагревания до 85°C в течение 10 мин и амплифицировали посредством ПЦР для дополнительных циклов пэннинга. Соединения с высокой аффинностью связывания выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени PSMA в каждом цикле от 400 до 100 нМ и увеличения жесткости условий промывки.

После пэннинга выбранные домены FN3 амплифицировали ПЦР, субклонировали в вектор pET, модифицированный путем включения сайта безлигазного клонирования, и трансформировали в клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) для экспрессии растворимого продукта в *E.coli* с применением стандартных методик молекулярной биологии. К каждому домену FN3 добавляли генную последовательность, кодирующую С-концевую полигистидиновую метку, для обеспечения возможности очистки и обнаружения. Культуры выращивали до достижения оптической плотности 0,6-0,8 в среде TB с добавлением 100

мкг/мл карбенициллина в 96-луночных блоках объемом 1 мл при 37°C, затем добавляли IPTG до 1 мМ и в этот момент температуру снижали до 30°C. Клетки собирали приблизительно через 16 ч путем центрифугирования и замораживали при -20°C. Лизирование клеток проводили путем инкубации каждого осадка в 0,6 мл буферного раствора для лизиса BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) со встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 мин.

#### **Отбор с использованием гранул**

Центририны также отбирали с использованием системы захвата на основе гранул. Реакционные смеси ИТТ получали, как описано выше, а впоследствии инкубировали с биотинилированными рекомбинантными белками: PSMA шимпанзе или яванского макака. Биотинилированные рекомбинантные белки и связанные элементы библиотеки захватывали магнитными гранулами, покрытыми нейтравидином или стрептавидином. Несвязанные элементы библиотеки удаляли путем последовательных промывок с использованием TBST и TBS. После промывки ДНК элюировали из белка-мишени путем нагревания до 85°C в течение 10 мин и амплифицировали посредством ПЦР для дополнительных циклов пэннинга. Соединения с высокой аффинностью связывания выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени PSMA в каждом цикле от 400 до 100 нМ и увеличения жесткости условий промывки.

#### **Отбор по скорости диссоциации**

Продукты выхода пятого цикла выбора с использованием гранул подвергли четырем циклам отбора по скорости диссоциации. После инкубирования реакционных смесей ИТТ с биотинилированными рекомбинантными белками шимпанзе или яванского макака белки и связанные элементы библиотеки захватывали магнитными гранулами, покрытыми нейтравидином или стрептавидином, и обильно промывали в TBST, связанные комплексы промывали в 5 мкМ холодных рекомбинантных белков PSMA в течение 1 ч. Впоследствии ИТТ, связанные с гранулами, обильно промывали в TBST и TBS с последующим элюированием. Концентрацию биотинилированного целевого антигена постепенно понижали с 25 нМ в циклах 6 и 7 до 2,5 нМ в циклах 8 и 9. Продукты отбора из циклов 7 и 9 субклонировали в модифицированный вектор pET15 для экспрессии и скрининга.

#### **Отбор библиотек созревания аффинности**

Создавали библиотеку созревания аффинности (TCL25) на основании последовательности клона P229CR9P819-H11 (SEQ ID NO: 40) с использованием технологии Slonomics в компании Morphosys (г. Мюнхен, Германия), в которой рандомизировали положения 23-30 из петли BC и положения 78-83 из петли FG. Связывание мишени в библиотеке поддерживали путем введения нуклеотидов, кодирующих исходную аминокислоту (из P229CR9P819-H11), с целевой частотой 65% для каждого рандомизированного положения. Оставшиеся 35% нуклеотидов конструировали с возможностью содержания смеси кодонов, кодирующих все остальные 20 природных аминокислот с равной вероятностью, за исключением цистеина и метионина, которые не были включены. В табл. 4 показана конфигурация библиотеки созревания TCL25. В таблице числа в скобках обозначают процентные доли молекул в библиотеке, разработанных с возможностью содержания соответствующей аминокислоты в каждом положении. Схема введения (65% исходных в 14 положениях) создает теоретическое распределение молекул, содержащее преимущественно 3, 4, 5, 6 или 7 изменений по сравнению с исходной молекулой.

Таблица 4

Положение	Исходная аминокислота	Распределение аминокислот (%)
23	Asp	(2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (65), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
24	Ile	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (65), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
25	Asp	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (65), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
26	Glu	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (65), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
27	Gln	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (65), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
28	Arg	ala (2,05), arg (65), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
29	Asp	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (65), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
30	Trp	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (65), val (2,05)

78	Tyr	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (65), trp (2,05), val (2,05)
79	His	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (65), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
80	Val	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (65)
81	Tyr	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (65), trp (2,05), val (2,05)
82	Arg	ala (2,05), arg (65), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (2,05), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)
83	Ser	ala (2,05), arg (2,05), asn (2,05), asp (2,05), gln (2,05), glu (2,05), gly (2,05), his (2,05), ile (2,05), leu (2,05), lys (2,05), phe (2,05), pro (2,05), ser (65), thr (2,05), tyr (2,05), trp (2,05), val (2,05)

CIS-дисплеи использовали для выбора центринов, связывающих PSMA, из библиотеки TCL25. Реакционные смеси ИТТ инкубировали с биотинилированными рекомбинантными белками: PSMA шимпанзе и яванского макака. Биотинилированные рекомбинантные белки и связанные элементы библиотеки захватывали магнитными гранулами, покрытыми нейтравидином или стрептавидином. Несвязанные элементы библиотеки удаляли путем последовательных промывок с использованием TBST и TBS. После промывки ДНК элюировали из белка-мишени путем нагревания до 85°C в течение 10 мин и амплифицировали посредством ПЦР для дополнительных циклов пэннинга. Связывающие соединения центринов выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени PSMA в каждом цикле от 400 нМ до 100 нМ и увеличения жесткости условий промывки.

Продукты выхода второго цикла выбора подвергали четырем циклам отбора по скорости диссоциации. После инкубирования реакционных смесей ИТТ с биотинилированными рекомбинантными белками PSMA белки и связанные элементы библиотеки захватывали магнитными гранулами, покрытыми нейтравидином или стрептавидином, и обильно промывали в TBST, связанные комплексы промывали в 5 мкМ холодных рекомбинантных белков PSMA в течение 1 ч. Впоследствии ИТТ, связанные с гранулами, обильно промывали в TBST и TBS с последующим элюированием. Концентрацию биотинилированного целевого антигена постепенно снижали с 25 нМ в циклах 3 и 4 до 2,5 нМ в циклах 5 и 6. Продукты отбора из циклов 7 и 9 субклонировали в модифицированный вектор pET15 для экспрессии и скрининга.

#### **Биохимический скрининг на выявление центринов, которые связываются с PSMA**

Планшеты, покрытые нейтравидином, блокировали в течение 1 ч в Starting Block T20 (Pierce), а впоследствии покрывали биотинилированным PSMA (с использованием того же антигена, что и при пэннинге) или отрицательным контролем в течение 1 ч. Планшеты промывали TBST и разведенный лизат наносили на планшеты в течение 1 ч. После дополнительных этапов промывки лунки обрабатывали антителами к центрину, конъюгированными с пероксидазой хрена (PAB25) в течение 1 ч, а впоследствии проводили анализ с помощью POD (Roche). Центрины с сигналами по меньшей мере в 10 раз выше фонового отбирали для дополнительного анализа.

#### **Анализ методом эксклюзионной хроматографии**

Для оценки состояния агрегации центрина, связывающего PSMA, применяли эксклюзионную хроматографию (SEC). Аликвоты (10 мкл) каждого очищенного центрина вводили в колонку Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин в подвижной фазе PBS с pH 7,4. Элюирование с колонки отслеживали по поглощению на 280 нм. Тенсон дикого типа включали в каждый анализ в качестве контроля. Для анализа профилей элюирования использовали программу Agilent ChemStation (Rev. B.

04.02). Для дополнительного определения характеристик отбирали только белки с профилями элюирования, схожими с таковым белка дикого типа в том же анализе.

#### **Высокопроизводительная экспрессия, конъюгация и очистка центринов**

Выделенные клоны из уникальных хитов, выявленных посредством ИФА биохимического связывания, объединяли в одном планшете для хитов для выращивания в 96-луночных блок-планшетах; клоны выращивали в культурах 1 мл (среда LB, обогащенная канамицином для отбора) при 37°C в течение ночи с перемешиванием. Для экспрессии белка в 96-луночных блок-планшетах в 1 мл среды TB, обогащенной канамицином, заседали 50 мкл инкубированной в течение ночи культуры и выращивали при 37°C с непрерывным перемешиванием при 300 об/мин до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub>=0,6-1. После достижения целевой OD экспрессию белка индуцировали добавлением IPTG до 1 mM; планшеты переносили в условия с температурой 30°C (300 об/мин) для выращивания в течение ночи. Инкубированные в течение ночи культуры центрифугировали для сбора клеток; бактериальные осадки хранили при -80°C до использования. Как положительные, так и отрицательные контроли наносили на каждый планшет в двух повторах.

Для конъюгирования с меткой сортазы бактериальные осадки размораживали, ресуспендировали и лизировали в BugBusterHT (EMD, каталожный № 70922), обогащенном рекомбинантным человеческим лизоцимом (EMD, каталожный № 71110). Лизис выполняли при комнатной температуре с осторожным перемешиванием, после чего планшеты переносили в условия с температурой 42°C для осаждения белков клетки-хозяина. Продукты распада осаждали путем центрифугирования, а супернатанты переносили в новый блок-планшет для катализируемого сортазой мечения. Основную смесь, содержащую Gly3-vc-MMAF (Concortis), без метки сортазы А и буферный раствор сортазы (трис, хлорид натрия и хлорид кальция) получали в 2-кратной концентрации и добавляли в равном объеме к супернатантам лизата. Реакцию мечения выполняли в течение двух часов при комнатной температуре, после чего белки очищали с использованием планшета Ni-NTA multi-trap HP (GE, каталожный № 28-4009-89). Конъюгаты белков восстанавливали путем стадийного элюирования с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего имидазол (50 mM трис, pH 7,5, 500 mM NaCl, 250 mM имидазол), стерилизовали посредством фильтрации и использовали непосредственно для клеточных анализов цитотоксичности.

Анализ цитотоксичности с высокой пропускной способностью конъюгатов центрина с лекарственным средством 96-луночные черные покрытые тканевой культурой планшеты (BD/Corning, каталожный № 353219) заседали клетками LNCaP FGC (ATCC, каталожный № CRL-1740) с плотностью 10 000 клеток/лунка в аналитической среде (RPMI, не содержащей фенолового красного (Life Technologies, каталожный № 11835-030), обогащенной эмбриональной бычьей сывороткой 5%). Засеянные планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 37°C с 5% CO<sub>2</sub>, чтобы позволить прикрепление клеток. Через двадцать четыре часа CDC разводили в аналитической среде (1: 100, 1: 300, 1: 1000 или 1: 3000) и наносили непосредственно на клетки LNCaP. Впоследствии клетки LNCaP инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 66-72 ч. Клеточную токсичность оценивали с использованием реагента CellTiter-Glo (Promega, каталожный № G7571); 100 мкл приготовленного реагента добавляли в обработанные лунки и инкубировали в течение десяти минут с осторожным перемешиванием, защищая от света. Люминесценцию измеряли с использованием спектрофотометра для считывания планшетов SpectraMax M5. Значения нормализовали по необработанным контролям и отбирали для дополнительного анализа в том случае, если достигнутая токсичность превышала 50%.

Пример 4. Определение характеристик центринов к PSMA Экспрессия и очистка в крупном масштабе

Последовательности генов, кодирующие мутанты центрина, выявляли посредством пэннинга и клонировали в вектор pET15b для экспрессии под управлением промотора T7 или создавали посредством DNA2.0 и субклонировали в вектор pJexpress401 (DNA2.0) для экспрессии под управлением промотора T5. Полученные плазмиды трансформировали в E.coli BL21 Gold (Agilent) или BL21DE3 Gold (Agilent) для экспрессии. Одну колонию отбирали и выращивали в бульоне Luria Broth (Teknova), обогащенном канамицином, и инкубировали 18 ч при 37°C и 250 об/мин. Один литр бульона Terrific Broth (Teknova), обогащенного канамицином, заседали этими субкультурами и выращивали при 37°C в течение 4 ч с перемешиванием. Экспрессию белка индуцировали с помощью 1 mM IPTG, когда оптическая плотность при абсорбции на 600 нм достигала 1,0. Белок экспрессировали в течение 4 ч при 37°C или в течение 18 ч при 30°C. Клетки собирали путем центрифугирования при 6000 g и хранили при температуре -20°C до очистки. Замороженный клеточный осадок (~ 15-25 г) размораживали в течение 30 мин при комнатной температуре и суспендировали в реагенте для экстракции белков BugBusterHT (EMD Millipore), обогащенном 0,2 мг/мл рекомбинантного лизоцима (Sigma), в соотношении 5 мл на грамм клеточной пасты и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. Лизат очищали путем центрифугирования при 74 600 g в течение 25 мин. Супернатант наносили на картридж Qiagen Ni-NTA 5 мл, погруженный в лед, со скоростью потока 4 мл/мин с помощью хроматографической системы АКТА AVANT. Все другие стадии хроматографии Ni-NTA выполняли со скоростью потока 5 мл/мин. Колонку Ni-NTA уравнивали в 25,0 мл 50 mM буферного раствора трис-HCl, pH 7,0, содержащего 0,5 M NaCl и 10 mM имидазола (буферный раствор А). После загрузки колонку промывали 100 мл буферного раствора А, с

последующей промывкой 100 мл 50 мМ буферного раствора трис-НСl, рН 7,0, содержащего 10 мМ имидазола, 1% детергентов CHAPS, и 1% н-октил-β-D-глюкопиранозида, и 100 мл буферного раствора А. Белок элюировали буферным раствором А, обогащенным 250 мМ имидазола, и помещали на препаративную гель-фильтрационную колонку, TSK Gel G3000SW 21,5×600 мм (Tosoh), уравновешенную в PBS (Gibco). Гель-фильтрационную хроматографию выполняли при комнатной температуре в PBS со скоростью потока 10 мл/мин, используя хроматографическую систему АКТА-AVANT.

#### **Определение термостабильности**

Термостабильность измеряли посредством капиллярной дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Каждый образец разводили в PBS, рН 7,4, до достижения концентрации 1 мг/мл. Для этих образцов измеряли температуры плавления с применением прибора VP-DSC, оснащенного автоматическим пробоотборником (MicroCal, LLC). Образцы нагревали с 10 до 95°C или 100°C со скоростью 1°C в минуту. Между сканированием каждого образца проводили сканирование только буферного раствора для расчета базовой линии для интегрирования. После вычитания сигнала только от буферного раствора данные аппроксимировали в соответствии с моделью сворачивания с двумя состояниями. Обратимость термической денатурации определяли путем повторного сканирования каждого образца без его извлечения из клетки.

#### **Селективная цитотоксичность конъюгатов центирина к PSMA с лекарственным средством на PSMA-положительных клетках**

Центирин конъюгировали с vc-MMAF с помощью цистеин-малеимидной химической реакции (Brinkley, Bioconjugate Chemistry 3:2-13, 1992) или с использованием описанной выше реакции с сортозой. Цитотоксичность конъюгатов центирина с vcMMAF оценивали в клетках LNCaP, VCAP, MDA-PC-2B и PC3 *in vitro*. Клетки помещали в 96-луночные черные планшеты на 24 ч, а впоследствии обрабатывали различными дозами конъюгатов центирина с vcMMAF. Клетки подвергали инкубированию с конъюгатами центирина с лекарственным средством (CDC) в течение 66-72 ч. Для оценки токсичности использовали реагент CellTiterGlo, как описано выше. Значения люминесценции импортировали в Excel, откуда их копировали и вставляли в программное обеспечение Prism для графического анализа. Данные трансформировали по уравнению  $X = \text{Log}(x)$ , затем анализировали с использованием нелинейной регрессии, используя 3-параметрическую модель для определения IC<sub>50</sub>.

В табл. 6 объединены уникальные хиты, выявленные в ходе пэннинга, охватывающие множество семейств последовательностей. Центирин показывали термостабильность в диапазоне 55-85°C и были цитотоксичными в отношении клеток LNCaP при конъюгировании с vcMMAF, при этом значения IC<sub>50</sub> составляли 22,6-0,38 нМ.

Пример 4. Определение характеристик центринов к PSMA

#### **Экспрессия и очистка в крупном масштабе**

Последовательности генов, кодирующие мутанты центирина, выявляли посредством пэннинга и клонировали в вектор pET15b для экспрессии под управлением промотора T7 или создавали посредством DNA2.0 и субклонировали в вектор rJexpress401 (DNA2.0) для экспрессии под управлением промотора T5. Полученные плазмиды трансформировали в *E. coli* BL21 Gold (Agilent) или BL21DE3 Gold (Agilent) для экспрессии. Одну колонию отбирали и выращивали в бульоне Luria Broth (Teknova), обогащенном канамицином, и инкубировали 18 ч при 37°C и 250 об/мин. Один литр бульона Terrific Broth (Teknova), обогащенного канамицином, засеивали этими субкультурами и выращивали при 37°C в течение 4 ч с перемешиванием. Экспрессию белка индуцировали с помощью 1 мМ IPTG, когда оптическая плотность при абсорбции на 600 нм достигала 1,0. Белок экспрессировали в течение 4 ч при 37°C или в течение 18 ч при 30°C. Клетки собирали путем центрифугирования при 6000 g и хранили при температуре -20°C до очистки. Замороженный клеточный осадок (~ 15-25 г) размораживали в течение 30 мин при комнатной температуре и суспендировали в реагенте для экстракции белков BugBusterHT (EMD Millipore), обогащенном 0,2 мг/мл рекомбинантного лизоцима (Sigma), в соотношении 5 мл на грамм клеточной пасты и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. Лизат очищали путем центрифугирования при 74 600 g в течение 25 мин. Супернатант наносили на картридж Qiagen Ni-NTA 5 мл, погруженный в лед, со скоростью потока 4 мл/мин с помощью хроматографической системы АКТА AVANT. Все другие стадии хроматографии Ni-NTA выполняли со скоростью потока 5 мл/мин. Колонку Ni-NTA уравновешивали в 25,0 мл 50 мМ буферного раствора трис-НСl, рН 7,0, содержащего 0,5 М NCl и 10 мМ имидазола (буферный раствор А). После загрузки колонку промывали 100 мл буферного раствора А, с последующей промывкой 100 мл 50 мМ буферного раствора трис-НСl, рН 7,0, содержащего 10 мМ имидазола, 1% детергентов CHAPS и 1% н-октил-β-D-глюкопиранозида, и 100 мл буферного раствора А. Белок элюировали буферным раствором А, обогащенным 250 мМ имидазола, и помещали на препаративную гель-фильтрационную колонку, TSK Gel G3000SW 21,5×600 мм (Tosoh), уравновешенную в PBS (Gibco). Гель-фильтрационную хроматографию выполняли при комнатной температуре в PBS со скоростью потока 10 мл/мин, используя хроматографическую систему АКТА-AVANT.

#### **Определение термостабильности**

Термостабильность измеряли посредством капиллярной дифференциальной сканирующей калори-

метрии (DSC). Каждый образец разводили в PBS, pH 7,4, до достижения концентрации 1 мг/мл. Для этих образцов измеряли температуры плавления с применением прибора VP-DSC, оснащенного автоматическим пробоотборником (MicroCal, LLC). Образцы нагревали с 10 до 95°C или 100°C со скоростью 1°C в минуту. Между сканированием каждого образца проводили сканирование только буферного раствора для расчета базовой линии для интегрирования. После вычитания сигнала только от буферного раствора данные аппроксимировали в соответствии с моделью сворачивания с двумя состояниями. Обратимость термической денатурации определяли путем повторного сканирования каждого образца без его извлечения из клетки.

#### Селективная цитотоксичность конъюгатов центирина к PSMA с лекарственным средством на PSMA-положительных клетках

Центирин конъюгировали с vc-MMAF с помощью цистеин-малеимидной химической реакции (Brinkley, Bioconjugate Chemistry 3:2-13, 1992) или с использованием описанной выше реакции с сортозой. Цитотоксичность конъюгатов центирина с vcMMAF оценивали в клетках LNCaP, VCAP, MDA-PC-2B и PC3 in vitro. Клетки помещали в 96-луночные черные планшеты на 24 ч, а впоследствии обрабатывали различными дозами конъюгатов центирина с vcMMAF. Клетки подвергали инкубированию с конъюгатами центирина с лекарственным средством (CDC) в течение 66-72 ч. Для оценки токсичности использовали реагент CellTiterGlo, как описано выше. Значения люминесценции импортировали в Excel, откуда их копировали и вставляли в программное обеспечение Prism для графического анализа. Данные трансформировали по уравнению  $X = \text{Log}(x)$ , затем анализировали с использованием нелинейной регрессии, используя 3-параметрическую модель для определения IC<sub>50</sub>.

В табл. 5 объединены уникальные хиты, выявленные в ходе пэннинга, охватывающие множество семейств последовательностей. Центирин показывали термостабильность в диапазоне 55-85°C и были цитотоксичными в отношении клеток LNCaP при конъюгировании с vcMMAF, при этом значения IC<sub>50</sub> составляли 22,6-0,38 нМ. В табл. 6, 7 и 8 показаны аминокислотные последовательности петли BC, C, CD, F и FG выбранных клонов. В табл. 9 показаны аминокислотные последовательности клонов.

Таблица 5

Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Виды антигена	LNCaP IC <sub>50</sub> (нМ)	T <sub>m</sub> (°C)
P229CR5P819_H11	40	Шимпанзе	20,7	78,1
P258AR6P1071_G03	35	Яванский макак	5,8	83,1
P258AR6P1070_A05	36	Яванский макак	4,6	83
P258AR6P1071_F04	37	Яванский макак	5,4	80,8
P258AR6P1070_F09	38	Яванский макак	0,9	79,8
P258AR6P1071_D02	39	Яванский макак	0,8	78,5
P234CR9_H01	46	Яванский макак	22,6	74,1
P234CR9_A7	45	Яванский макак	8,8	Нет данных
P233FR9_H10	41	Шимпанзе	0,4	65,5
P233FR9P1001_D9	44	Шимпанзе	1,4	58,1
P233FR9P1001_B5-5	42	Шимпанзе	0,5	65
P233FR9P1001_H3-1	43	Шимпанзе	0,4	64,5

Таблица 6

Идентификационный номер клона		Петля BC		Петля C	
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
P229CR5P819_H11	40	DIDEQRDW	56	FDSFLIQYQE	63
P258AR6P1071_G03	35	DIDEQRDW	56	FDSFLIQYQE	63
P258AR6P1070_A05	36	TIDEQRDW	57	FDSFLIQYQE	63
P258AR6P1071_F04	37	VIDEQRDW	58	FDSFLIQYQE	63
P258AR6P1070_F09	38	TIDEQRDW	57	FESFLIQYQE	64
P258AR6P1071_D02	39	AIDEQRDW	59	FESFLIQYQE	64
P234CR9_H01	46	EWVVI PGD	60	FDSFLIQYQE	63
P234CR9_A7	45	GEQFTI	61	FDSFLIQYQE	63
P233FR9_H10	41	TAPDAA	62	FDSFAIGYWE	65
P233FR9P1001_D9	44	TAPDAA	62	FDSFPIGYWE	66
P233FR9P1001_B5-5	42	TAPDAA	62	FDSFTIGYWE	67
P233FR9P1001_H3-1	43	TAPDAA	62	FDSFPIGYWE	66

Таблица 7

Идентификационный номер клона		Петля CD		Петля F	
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
P229CR5P819_H11	40	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P258AR6P1071_G03	35	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P258AR6P1070_A05	36	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P258AR6P1071_F04	37	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P258AR6P1070_F09	38	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P258AR6P1071_D02	39	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P234CR9_H01	46	SEKVGGE	68	TEYTVSIYGV	70
P234CR9_A7	45	SEKVGGE	68	TEYTVSIYG	71
P233FR9_H10	41	WDDDGE	69	TEYPVYIAGV	72
P233FR9P1001_D9	44	WDDDGE	69	TEYWVYIAGV	73
P233FR9P1001_B5-5	42	WDDDGE	69	TEYPVYIAGV	72
P233FR9P1001_H3-1	43	WDDDGE	69	TEYHVYIAGV	74

Таблица 8

Идентификационный номер клона		Петля FG	
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
P229CR5P819_H11	40	YHVYRSSN	75
P258AR6P1071_G03	35	YHVYRSN	76
P258AR6P1070_A05	36	YHVYRSN	76
P258AR6P1071_F04	37	YHVYRSN	76
P258AR6P1070_F09	38	YHVYRSN	76
P258AR6P1071_D02	39	YHVYRSN	76
P234CR9_H01	46	VNSGQWNDTSN	77
P234CR9_A7	45	ASGYEWFHAFGSSN	78
P233FR9_H10	41	KGGQWSF	79
P233FR9P1001_D9	44	KGGQWSF	79
P233FR9P1001_B5-5	42	KGGQWSF	79
P233FR9P1001_H3-1	43	KGGQWSF	79

Таблица 9

Клон		
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность
P229CR5P819_H11	40	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_G03	35	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1070_A05	36	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_F04	37	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1070_F09	38	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02	39	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIIDEQRDWFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P234CR9_H01	46	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEWVPIPGDFDSFL IQYQSEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSIYGVVNSGQWNDTSNPLSAIFTT
P234CR9_A7	45	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGEQFTIFDSFLIQYQ ESEKVGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIY GASGYEWFHAFGSSNPLSAIFTT
P233FR9_H10	41	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIG YWEWDDDGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYF VYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001_D9	44	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIG YWEWDDDGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYF VYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001_B5-5	42	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIG YWEWDDDGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYF VYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001_H3-1	43	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIG YWEWDDDGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYH VYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT

Выбранные конъюгаты центиринина с лекарственным средством тестировали по панели клеточных линий. В табл. 10 показаны значения  $IC_{50}$  для нескольких центринов, конъюгированных с vcMMAF. Данные представляют собой средние значения от одного до девяти подборов кривой. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  СПС. CDC были наиболее активными в клетках LNCaP, которые, как известно, экспрессируют высокие концентрации PSMA. CDC также были активными в клетках MDA-PCA-2B и VCAP, которые представляют собой линии раковых клеток предстательной железы с более низкими концентрациями PSMA. Активность отсутствовала в клетках PC3 (PSMA-отрицательная клеточная линия), что указывает на селективность.

Таблица 10

Клон	SEQ ID NO:	Анализ цитотоксичности конъюгатов центиринина с лекарственным средством			
		$IC_{50}$ (нМ) клеток LNCaP	Клетки MDA-PCA-2B $IC_{50}$ (нМ)	Клетки VCAP $IC_{50}$ (нМ)	Клетки PC3 $IC_{50}$ (нМ)
P233FR9P1001-H3-1	43	0,4	$4,6 \pm 1,2$	$15,2 \pm 1,0$	> 500
P234CR9_H01	46	22,6	$150,8 \pm 4,4$	$401,0 \pm 130,0$	> 500
P233FR9_H10	41	$0,5 \pm 0,1$	$5,8 \pm 2,3$	$25,9 \pm 15,0$	> 500
P229CR5P819_H11	40	$9,3 \pm 1,9$	$106,8 \pm 13,6$	$231,0 \pm 38,0$	> 500

Пример 5. Конструирование центринов к PSMA

#### Сканирование цистеином

Гены, кодирующие центрин к PSMA, P233FR9\_H10, с остатками цистеина, введенными в различные положения в белке, получали с помощью DNA2.0 и использовали для экспрессии и очистки белков, как описано выше. Полученные центрины оценивали на термостабильность (с конъюгатом с vcMMAF и без него) и цитотоксичность к LNCaP, как описано выше. Результаты представлены в табл. 11.

Таблица 11

Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Положение цистеина *	Термостабильность (NEM-кэпированный)	Термостабильность (конъюгированный с vcMMAF)	Цитотоксичность к LNCaP ( $IC_{50}$ ; нМ)
P233FR9_H10 (C-концевой)	47	C-конец	TBD	TBD	Нет данных
P233FR9_H10 (K62C)	51	K62	56,91	54,03	0,69
P233FR9_H10 (R11C)	50	R11	65,72	63,58	0,40
P233FR9_H10 (E53C)	49	E53	66,75	65,98	0,66

\* Нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 41

Пример 6. Визуализация биораспределения ненацеленных центринов

Центрин, не способный специфически связываться с антигеном-мишенью, сконструированный так, что включает цистеин в положении 62, конъюгировали с DOTA, а впоследствии с радиоизотопом цирконием-89 в IsoTherapeutics Group, LLC (г. Англтон, штат Техас). Кастрированных самцов мышей линии NSG (Jackson laboratories) анестезировали 1,5% изофлураном и подвергали исследованию в микросистеме ПЭТ/КТ Siemens Inveon. Мышам вводили приблизительно 0,2 мКи [89Zr] центиринина (SEQ ID 51) посредством инъекции в хвостовую вену (с доведением дозы до 1 мг/кг холодным центрином) и выполняли непрерывную визуализацию в течение первых 60 мин, а впоследствии через 3, 6 и 24 ч после инъекции центиринина.

Трехмерные ПЭТ-изображения реконструировали с использованием двухмерного EM-алгоритма для упорядоченных подмножеств (Siemens Healthcare, г. Ноксвилл, штат Теннесси, США) в томографическом объеме  $768 \times 768 \times 512$  с размером вокселя  $0,107 \text{ мм} \times 0,107 \text{ мм} \times 0,107 \text{ мм}$ . Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения PMOD v3.0 (PMOD Technologies, г. Цюрих, Швейцария). Цилиндр известной активности сканировали в ПЭТ-сканере для выполнения перекрестной калибровки между введенной дозой, измеренной калибратором дозы, и количеством импульсов на один воксель на ПЭТ-изображениях. Каждое ПЭТ-изображение регистрировали вместе с КТ-изображением для получения анатомического ориентира с использованием программы слияния изображений PMOD. Области интереса (ОИ) обрисовывали вокруг каждой 4-й секции для каждой анализируемой ткани. Получали средние количества импульсов на один воксель и преобразовывали в проценты введенной посредством инъекции дозы на грамм массы тела, используя поправочный коэффициент, полученный из калибровочного цилиндра известной активности. Все измеренные значения радиоактивности корректировали на распад с использованием известного периода полужизни Zr-89 (78,41 ч).

На фиг. 1 показано распределение в ткани домена FN3, меченного радиоактивным изотопом, во

времени. Обнаружили быстрое накопление в почках и мочевом пузыре, и только небольшое количество накапливалось в печени, что указывает на выведение центринов через почки.

Пример 7. Кристаллическая структура антитела P233FR9-H10 к PSMA в комплексе с PSMA яванского макака

Центирин P233FR9-H10 с гистидиновой меткой (называемый в настоящем описании центрином H10) экспрессировали в *E. coli* и очищали с использованием аффинной и эксклюзионной хроматографии. Центирин принимали в dPBS, pH 7,2.

Внеклеточный домен PSMA яванского макака в виде C-концевого гибридного белка с Fc-доменом huIgG1 экспрессировали в клетках GnT1 и очищали посредством аффинной и эксклюзионной хроматографии. Гибридный белок принимали в dPBS, 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7,2. Впоследствии Fc-домен удаляли путем обработки протеазой Prescission с последующим выполнением аффинной и эксклюзионной хроматографии. Выделенный внеклеточный домен PSMA яванского макака (суноPSMA) хранили в dPBS, 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7,2.

Комплекс центирин H10/PSMA яванского макака получали путем смешивания PSMA яванского макака с центрином H10 в молярном соотношении 1:3 (избыток центрина), одновременно выполняя диализ в течение 48 ч при 4°C с 20 mM Hepes, при pH 7,0, 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>. Впоследствии комплекс элюировали из колонки monoS с градиентом 48-68 mM NaCl, 20 mM Hepes, при pH 7,5, 10%-м глицерином и концентрировали до 3,4 мг/мл. Кристаллы, пригодные для рентгеновской дифракции, получали из 25% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 M ацетата Na pH 4,5 с помощью метода диффузии паров в сидячей капле при 20°C.

Для сбора данных рентгена один кристалл замачивали на несколько секунд в маточном растворе, содержащем раствор криопротектора, с добавлением 20%-го глицерина и мгновенно замораживали в жидком азоте. Данные рентгеновской дифракции получали с помощью пиксельного матричного детектора Dectris Pilatus 6M в канале излучения 17-ID усовершенствованного источника синхротронного излучения (APS) в Аргоннской национальной лаборатории. Данные дифракции обрабатывали с помощью программного обеспечения HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). Статистика данных рентгенографического анализа представлена в табл. 12.

Структуру восстанавливали методом молекулярного замещения (M3) с помощью Phaser (Read, 2001). Моделями исследования для M3 были кристаллические структуры человеческого PSMA (код PDB: 2C6G) и структура центрина P114AR7P94-A3 W33A. Структуры очищали с помощью PHENIX (Adams et al, 2004), а корректировки модели выполняли с использованием COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Все другие кристаллографические расчеты проводили с использованием пакета программ CCP4 (CCP4, 1994). Все молекулярные графики получали при помощи PyMol (DeLano, 2002). Статистика по уточнению структуры представлена в табл. 12.

Таблица 12

	PS42
<b>Параметры кристалла</b>	
Кристаллизирующий раствор	
0,1 М буферный раствор	Ацетат, pH 4,5
Осаждающее вещество	25% ПЭГ, 3 кДа
Добавка	0,2 М NH <sub>4</sub> Cl
Пространственная группа	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Комплекс/асимметричная единица	2
Элементарная ячейка	
a (Å)	84,0
b (Å)	109,9
c (Å)	261,6
V <sub>m</sub> (Å <sup>3</sup> /Да)	3,32
Содержание растворителя (%)	63
<b>Данные рентгеноструктурного анализа *</b>	
Разрешение (Å)	50,00-2,80
Оболочка высокого разрешения (Å)	(2,85-2,80)
Измеренные отражения	335 467
Уникальные отражения	57 166
Полнота (%)	93,2 (69,3)
Избыток	5,9 (4,4)
R-симм. (%)	25,1 (64,1)
<I/σ>	6,4 (1,6)
<b>Оптимизация</b>	
Разрешение (Å)	40,0-2,8
Количество отражений	57 063
Число всех атомов	12 330
Число атомов воды	8
R-фактор (%)	25,14
R-своб. (%)	31,28
RMSD	
длины связи (Å)	0,003
углы связи (°)	0,998
Средний B-фактор (Å <sup>2</sup> )	78,9
График Рамачандрана	
благоприятная область (%)	94,9
допустимая область (%)	4,8
отклоняющиеся значения (%)	0,3

\*В скобках показаны значения для оболочки с высоким разрешением.

Структура гомодимерного PSMA яванского макака включает в себя остатки 57-750, соответствующие протеазному (остатки 57-116 и 352-590), верхушечному (остатки 117-351) и спиральному (остатки 591-750) доменам, и восемь из одиннадцати возможных N-сцепленных гликанов (в Asn-76, -121, -140, -195, -459, -476, 613 и -638) на одну субъединицу димера. Активный участок PSMA яванского макака размещен на поверхности раздела между тремя доменами, и он содержит два атома цинка, скоординированных гистидином (H377 и H553) и остатками глутамата/аспартата (D387, каталитический E424, E425 и D453), и молекулу воды. Структура центирин H10 (SEQ ID NO: 41) содержит остатки 2-92. Остатки H10 последовательно пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 41. Остатки PSMA яванского макака пронумерованы в соответствии с полноразмерной последовательностью PSMA яванского макака с SEQ ID NO: 141. Зрелый PSMA яванского макака (без сигнального пептида) начинается с остатка 44 SEQ ID NO: 141.

Имеется один гомодимер PSMA яванского макака в асимметрическом звене и один центирин H10, связанный с каждой субъединицей PSMA (фиг. 2A). Два комплекса из центирин/PSMA являются структурно очень схожими, на что указывает среднеквадратическое отклонение (СКО), равное 0,72 Å для суперпозиции всех эквивалентных атомов в субъединицах PSMA. Также имеется высокая степень структурной схожести между PSMA человека и яванского макака и отсутствие больших конформационных изменений, вызванных связыванием с центрином, на что указывает СКО, равное 0,5 Å для суперпозиции атома Cα между молекулой PSMA яванского макака в комплексе центирин и несвязанным PSMA человека (код PDB: 2OOT, структура с разрешением 1,6 Å). Интересная особенность состоит в том, что область петли 541-547 является видимой только в белке яванского макака из-за стабилизации конформации петли посредством взаимодействий с центрином.

Сайт объединения центирин с PSMA хорошо обозначен на карте электронной плотности  $2F_{obs}-F_{calc}$ , что позволяет выполнять надежное позиционирование связывающих остатков. В следующем разделе описаны только взаимодействия между цепями B и C (цепи PSMA и центирин, соответственно).

Центирин H10 связывается с областью вблизи активного сайта PSMA (фиг. 2A) и охватывает область PSMA яванского макака около 1170 Å<sup>2</sup>, а именно центирин распознает остатки PSMA яванского макака в протеазном (Y460, F488, K499-P502, P504, R511, K514, N540-E542 и N544-F546), верхушечном (остаток R181) и спиральном (остатки K610, N613 и I614) доменах, как показано на фиг. 3 и 4.

Лицевая сторона четырехтяжевого β-листа центирин складывается на поверхности PSMA таким

образом, что одна петля CD глубоко вставлена во вход активного сайта (фиг. 2B и 2C). А именно, остатки домена FN3 H10, участвующие в связывании с PSMA, размещены в  $\beta$ -тяжах C (A32 и G34), D (V46), F (G64, P68, Y70 и A72) и G (S84-I86) и петлях CD (W36, W38-D41, E43 и A44) и FG (W79, F81 и P82). Остатки D39, D40, D41 и E43 передают отрицательный заряд петле CD центирин, и эти остатки вставлены в положительно заряженную воронку глубиной  $\sim 20$  Å, которая ведет к ионам цинка в активном сайте, вероятно блокируя вхождение субстрата в воронку и ферментативную активность PSMA (фиг. 2B и 2C). Однако центирин не взаимодействует непосредственно с ионами цинка или координирующими их остатками.

Консервативные остатки PSMA W541, Y460, F488, P502 и P504 формируют ароматический кластер по всему сайту объединения с остатками центирин W36, P68, Y70, W79, F81 и P82 (фиг. 3A). Консервативный R511 находится в центральном положении сайта объединения и связан водородными связями с Y70, который представляет собой центральный остаток в четырехтяжевом  $\beta$ -листе центирин. На фиг. 3B показаны в виде рисунка остатки паратопа и эпитопа.

PSMA человека и яванского макака идентичны на 97%, и за исключением изменения S613N все остатки, взаимодействующие с H10, являются консервативными для двух видов (фиг. 4). Изменение S613N приводит к гликозилированию N613 в PSMA яванского макака и созданию контактов Ван-дер-Ваальса между углеводом и остатками E66, 186, T88 ( $\beta$ -тяжи F и G) центирин, которых не будет в человеческом ферменте.

#### **Остатки центирин для конъюгации**

Различные остатки центирин H10 за пределами сайта объединения могут быть модифицированы для конъюгации с малыми молекулами (токсины) без нарушения связывания с PSMA или сворачивания центирин. Цистеины уже были расположены и конъюгированы с токсинами на С-конце (за гистидиновой меткой) и в положениях R11, E53 и K62, и все эти варианты продемонстрировали схожую эффективную цитотоксичность. Кроме того, остатки T22, D25 и A26 в петле BC, концевой остаток N6 и S52 в петле DE представляют собой потенциально хорошие сайты для мутагенеза с последующей химической конъюгацией (фиг. 5). Эти подверженные воздействию растворителя остатки находятся на удалении от поверхности раздела центирин/PSMA и размещены в структурно гибких областях.

Более того, N- и С-концевые области не содержат слияний с доменами других белков. N-конец направлен к протеазному домену PSMA и достигаем для линкера слияния, а другой также доступный С-конец направлен к спиральному домену PSMA. Оптимальная длина линкера до молекулы, сливающейся с центирин, будет зависеть от структуры сливающейся молекулы и расположения ее сайта связывания на молекуле-мишени.

#### **Механизм действия**

Центирин H10 представляет собой потенциальную молекулу для нацеленной доставки токсинов (токсических малых молекул, нуклеиновых кислот и т.д.) в клетки рака предстательной железы за счет интернализации комплекса центирин/PSMA. Более того, центирин H10 представляет собой потенциальную молекулу для перенаправления иммунных клеток к клеткам рака предстательной железы при нахождении в мультиспецифической форме.

Центирин H10, вероятно, также ингибирует ферментативную активность PSMA, что может приводить к снижению приспособляемости и выживаемости клетки. В структуре центирин/PSMA яванского макака центирин связан со входом в активный сайт, что может предотвращать взаимодействие субстрата с PSMA посредством стерического заграждения и прямой конкуренции за сайт связывания.

Пример 8. Создание дополнительных вариантов центирин к PSMA

Выбранный центирин к PSMA дополнительно конструировали для улучшения свойств исходного центирин. Затем с помощью описанных выше библиотек создавали домены FN3, связывающиеся с PSMA, и тестировали их на связывание с PSMA.

В табл. 13 показаны аминокислотные последовательности созданных молекул.

Таблица 13

Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность
P258AR6P1071_D02_v1	75	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAADQDRWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v2	76	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIAEQDRWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v3	77	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDAQDRWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v4	78	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEARDWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v5	79	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQDRWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v6	80	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRAWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v7	81	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDAFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v8	82	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQDRWFESFLIQ YQSEKVGGEAIVLTPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT

P258AR6P1071_D02_v9	83	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYAVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v10	84	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHAYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v11	85	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVARSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v12	86	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYASNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v13	87	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFASFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v14	88	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFESFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v15	89	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFDSFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v16	90	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTE YTVSIIYGVYHVYRSSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v17	91	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFDSFLIQ YQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVYHVYRSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v18	92	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFESFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTE YTVSIIYGVYHVYRSSNPLSAIFTT
P258AR6P1071_D02_v19	93	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFDSFL IQYQESEKVGAEIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTE YTVSIIYGVYHVYRSSNPLSAIFTT
P233FR9_H10_v1	94	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYRVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v2	95	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYRVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v3	96	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT

P233FR9_H10_v4	97	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v5	98	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYDVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v6	99	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYAVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v7	100	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYGVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v8	101	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v9	102	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYLVIYA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v10	103	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYIVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v11	104	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v12	105	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v13	106	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYNVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v14	107	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYQVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v15	108	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYSVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v16	109	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v17	110	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT

P233FR9_H10_v18	111	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>A</b> YW EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v19	112	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>S</b> YW EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v20	113	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> YW EWD <b>T</b> DG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v21	114	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> YW EWD <b>S</b> DG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v22	115	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>Y</b> EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v23	116	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>F</b> EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v24	117	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>L</b> EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v25	118	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>Y</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v26	119	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>F</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v27	120	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>L</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v28	121	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>W</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>Y</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v29	122	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>W</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>F</b> SFPLSAIFTT
P233FR9_H10_v30	123	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAI <b>G</b> Y <b>W</b> E <b>W</b> DDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVYIA GVKGGQ <b>L</b> SFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v1	124	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF <b>R</b> IGYW EWDDDG <b>E</b> AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEY <b>H</b> VYIA GVKGGQ <b>W</b> SFPLSAIFTT

P233FR9P1001-H3-1_v2	125	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v3	126	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v4	127	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v5	128	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v6	129	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v7	130	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v8	131	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v9	132	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v10	133	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v11	134	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v12	135	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIG YWEWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYH VYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v13	136	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v14	137	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v15	138	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v16	139	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT
P233FR9P1001-H3-1_v17	140	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIGYW EWDDDGGEAIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYHVYIA GVKGGQWSFPLSAIFTT

Пример 9. Обнаружение экспрессии PSMA на опухолевых клетках с использованием центрина к PSMA, конъюгированного с флуоресцентным красителем.

В данном примере показано обнаружение PSMA, присутствующего на клетках, с помощью центрина к PSMA, конъюгированного с флуоресцентным красителем. Меченный гистидиновой меткой на C-конце центрин к PSMA P233FR9\_H10 (SEQ ID NO: 49) со свободным цистеином в положении аминокислоты 53 конъюгировали с R-фикоэритрином (PE) (Prozyme, каталожный № PB31). Фикоэритрин (PE) активировали с помощью сульфо-SMCC (Pierce, каталожный № 22122) в течение 60 мин и активированный PE отделяли от свободного сульфо-SMCC посредством гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Sephadex G25 и буферного раствора PBS/ЭДТА. Центрин восстанавливали с помощью TCEP (Sigma, каталожный № 646547) в течение 30 мин. Восстановленный центрин отделяли от свободного TCEP посредством гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Se-

phadex G25 и буферного раствора PBS/ЭДТА. Активированный R-PE ковалентно связывали с восстановленным центирином в течение 90 мин с последующим гашением N-этилmaleимидом (Sigma, каталожный № 04260) в течение 20 мин. "PE-конъюгированный центирин" очищали посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием колонки Tosoh TSKgel G3000SW в 100 мМ фосфате натрия, 100 мМ сульфате натрия, азиде натрия 0,05%, pH 6,5 на жидкостном хроматографе высокого разрешения (FPLC) АКТА explorer (General Electric).

PE-конъюгированный центирин протестировали на чувствительность и специфичность с использованием PSMA-положительных и отрицательных клеточных линий посредством проточной цитометрии и анализа циркулирующих опухолевых клеток (CTC) CellSearch. Следующие линии клеток предстательной железы приобрели из коллекции ATCC и использовали для определения специфичности центирин к PSMA: LNCaP (высокая экспрессия PSMA), 22Rv1 (низкая экспрессия PSMA) и PC3 (экспрессия PSMA отсутствует).

#### **Обнаружение PSMA на клеточных линиях посредством проточной цитометрии**

С помощью стандартных процедур получения клеточных линий собирали линии клеток предстательной железы. Клетки (~ 30 000) окрашивали в 0,1 мл PBS, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) с PE-конъюгированным центирином, в течение 20 мин. В качестве положительного контроля использовали конъюгат антитела к PSMA с PE от компании Biolegend (клон LNI-17, каталожный № 342504). После инкубации добавляли 3 мл буферного раствора PBS/BSA, а несвязанный PE-конъюгат удаляли центрифугированием при 800 g в течение 5 мин. Супернатант аспирировали, а клетки ресуспендировали в 0,3 мл PBS/BSA. Образцы анализировали с помощью FACSCalibur компании BD Biosciences. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) окрашивания PSMA в каждой клеточной линии и сравнивали ее с СИФ, полученной с использованием антитела к PSMA. СИФ напрямую связана с уровнем экспрессии PSMA, при этом более высокая СИФ наблюдается в клеточной линии с высокой экспрессией PSMA. На фиг. 6 показаны значения СИФ в различных клеточных линиях, полученные с использованием PE-конъюгированного центирин, по сравнению со значениями СИФ, полученными с использованием комплекса антитела к PSMA с PE.

Результаты показывают, что PE-конъюгированный центирин связывается с PSMA-положительными клеточными линиями и не связывается неспецифически с PSMA-отрицательными клетками. Как ожидалось, СИФ выше в клеточной линии (LNCaP) с высокой экспрессией PSMA по сравнению с низкой СИФ в клеточной линии (22Rv1) с низкой экспрессией PSMA. СИФ в PSMA-отрицательной клеточной линии (PC3) практически равна фоновому сигналу. Кроме того, эффективность PE-конъюгированного центирин E в отношении связывания с различными клеточными линиями является схожей с таковой у PE-конъюгированного антитела к PSMA, так как схожие значения СИФ были получены с использованием обоих конъюгатов (центирин и антитела). Этот пример показывает, что PE-конъюгированный центирин обладает чувствительностью и специфичностью в отношении обнаружения PSMA на опухолевых клетках.

#### **Обнаружение PSMA посредством анализа циркулирующих опухолевых клеток**

Приведенные выше результаты дополнительно подтверждали посредством тестирования PE-конъюгированного центирин в анализе CELLSEARCH для обнаружения и подсчета циркулирующих опухолевых клеток (CTC) в 7,5 мл крови. Подсчет циркулирующих опухолевых клеток с использованием CELLSEARCH (Veridex LLC, г. Раритан, штат Нью-Джерси, США) выполняли после обучения в соответствии с инструкциями производителя. В анализе CELLSEARCH для захвата CTC используются антитела к EpCAM, конъюгированные с магнитными частицами в ферромагнитной жидкости, а для их визуализации используются антитела к цитokerатину, специфичные к цитokerатинам 8, 18 и 19, конъюгированные с флуоресцеином. В анализе CELLSEARCH используется CELLSEARCH AutoPrep для подготовки образцов и анализатор CELLTRACKS Analyzer II® (СТА II) для анализа. СТА II представляет собой четырехцветный полуавтоматический флуоресцентный микроскоп, который используется для выявления и подсчета CTC с применением 3 цветов. Четвертый цвет в СТА II можно использовать для фенотипирования CTC с дополнительными интересующими маркерами. В этом примере опухолевые клетки тканевой культуры помещали в нормальную кровь для имитации CTC в крови. Приблизительно 500 опухолевых клеток (клетки LNCaP, 22Rv1, PC3-9 или SKBR3) добавляли в 7,5 мл нормальной донорской крови, собранной в пробирку CELLSAVE (Janssen Diagnostics). Также в качестве PSMA-отрицательной клеточной линии использовали клеточную линию рака молочной железы (SKBR3). Образцы обрабатывали в AutoPrep с использованием набора CELLSEARCH CXC и PE-конъюгированного центирин в качестве маркера.

#### **Система подготовки образцов**

AutoPrep увеличивает концентрацию опухолевых клеток посредством захвата опухолевых клеток с помощью ферромагнитной жидкости к EpCAM. Обогащенные CTC образцы окрашивали красителем для нуклеиновых кислот (DAPI) для выявления ядросодержащих клеток, антителами к цитokerатину, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), для выявления опухолевых клеток и антителами к лейкоцитам, конъюгированными с аллофикоцианином (APC) для выявления лейкоцитов. Образец обра-

батывали до достижения конечного объема 0,32 мл и переносили в камеру для образца, находящуюся внутри устройства представления клеток MagNest®. Устройство MagNest® представляет клетки с магнитной меткой для анализа в анализаторе CELLTRACKS Analyzer II®. Образцы анализировали с использованием СТАП для подсчета CTC и обнаружения на CTC PSMA. Анализатор автоматически анализирует образцы и представляет потенциальные опухолевые клетки, положительные по DAPI и цитокератину, в виде миниатюрных изображений для просмотра. Результаты оценки опухолевых клеток, окрашенных PE-конъюгированным центрином, в анализе CellSearch, показаны на фиг. 7. Изображения CTC, окрашенных PE-конъюгированным центрином, показаны в столбцах с заголовком PSMA-PE.

На фиг. 7А показана экспрессия PSMA на опухолевых клетках LNCaP, причем 100% этих клеток являются PSMA-положительными. 26% клеток клеточной линии с низкой экспрессией PSMA (22Rv1) являются PSMA-положительными (фиг. 7В). С другой стороны, PSMA-отрицательные клеточные линии (PC3-9 и SKBR3) являются PSMA-отрицательными (фиг. 7С и 7D). Эти результаты согласуются с результатами проточной цитометрии. Этот пример показывает, что центрин может быть использован для обнаружения экспрессии PSMA на CTC и дополнительно подтверждает чувствительность и специфичность центрина к PSMA.

### Последовательности

SEQ ID NO: 1=Исходная последовательность Tencon

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT

SEQ ID NO: 2=Библиотека TCL1

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLT

GLKPGTEYTVSIYGV(X)<sub>7-12</sub>PLSAEFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> представляют собой любую аминокислоту; и

X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> и X<sub>12</sub> представляют собой любую аминокислоту или удалены.

SEQ ID NO: 3=Библиотека TCL2

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>SFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSER

SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>SX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>LSAEFTT;

где

X<sub>1</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>2</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>3</sub> - это Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>4</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>5</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>6</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>7</sub> представляет собой Phe, Ile, Leu, Val или Tyr;

X<sub>8</sub> представляет собой Asp, Glu или Thr;

X<sub>9</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>10</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>11</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>12</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>13</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly,

His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val;

X<sub>14</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val; и

X<sub>15</sub> представляет собой Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val.

SEQ ID NO: 4=Стабилизированная Tencon

LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 5=TCL7 (петли FG и BC)

LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>FDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVP  
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>SNPLSAIFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub> и X<sub>16</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и

X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>18</sub> и X<sub>19</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или удалены.

SEQ ID NO: 6=TCL9 (петля FG)

LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYTVSIYGV X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub> X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>SNPLSAIFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> и X<sub>7</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W или Y; и

X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> и X<sub>12</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y или удалены.

**Библиотека TCL14 (SEQ ID NO: 7):**

LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIVLTVPGSERS  
YDLTGLKPGTEYX<sub>8</sub>VX<sub>9</sub>IX<sub>10</sub>GVKGGX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>SX<sub>13</sub>PLSAIFTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub> и X<sub>13</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y, C или M.

**Библиотека TCL24 (SEQ ID NO: 8)**

LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKVGGEAIX<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>VPGSE  
RSYDLTGLKPGTEYX<sub>10</sub>VX<sub>11</sub>IX<sub>12</sub>GVKGGX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SX<sub>15</sub>PLX<sub>16</sub>AX<sub>17</sub>FTT;

где

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> и X<sub>17</sub> представляют собой A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, Y или W.

SEQ ID NO: 9=Sloning-FOR

GTGACACGGCGGTTAGAAC

SEQ ID NO: 10=Sloning-REV

GCSTTTGGGAAGCTTCTAAG

SEQ ID NO: 11=POP2250

CGGCGGTTAGAACGGGCTACAATTAATAC

SEQ ID NO: 12=DigLigRev

CATGATTACGCCAAGCTCAGAA

SEQ ID NO: 13=BC9

GTGACACGGCGGTTAGAACGGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG  
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAG  
 GAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACC  
 TGACCGGTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCC  
 AAAGGC

SEQ ID NO: 14=BC8

GTGACACGGCGGTTAGAACGGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG  
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAA  
 TCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGA  
 CCGGTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAA  
 GGC

SEQ ID NO: 15=BC7

GTGACACGGCGGTTAGAACGGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG  
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAA  
 TCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCG  
 GTCTGAAACCGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC

SEQ ID NO: 16=BC6

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCG  
 TCTGTCTTGGNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
 AAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
 TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC  
 SEQ ID NO: 17=130 mer-L17A  
 CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCG  
 GCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCTACCATG  
 CTG

SEQ ID NO: 18=POP222ext

CGG CGG TTA GAA CGC GGC TAC AAT TAA TAC

SEQ ID NO: 19=LS1114

CCA AGA CAG ACG GGC AGA GTC TTC GGT AAC GCG AGA AAC AAC CAG  
 GTT TTT CGG CGC CGG CAG CAT GGT AGA TCC TGT TTC

SEQ ID NO: 20=LS1115

CCG AAG ACT CTG CCC GTC TGT CTT GG

SEQ ID NO: 21=LS1117

CAG TGG TCT CAC GGA TTC CTG GTA CTG GAT CAG GAA AGA GTC GAA

SEQ ID NO: 22=SDG10

CATCGGCTCTTCCGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTCTGACCGTTCCGGGT

SEQ ID NO: 23=SDG24

GGTGGTGAAGATCGCAGACAGCGGGTTAG

SEQ ID NO: 24=POP2222

CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC

SEQ ID NO: 25=SDG28

AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCACCGCCGGTGGTGAAGATCGCAG

AC

SEQ ID NO: 26=FG12

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
 ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
 GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
 TCTGTCTTGGACCGCCGGACGCGGCTTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
 AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
 TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGCGGTACCATCACCATCAC  
CATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 27=FG11

GTGACACGGCGGTTAGAACGGCGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
TCTGTCTTGGACCGCGCCGGACGCGGCTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGCGGTACCATCACCATCACCAT  
GGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 28=FG10

GTGACACGGCGGTTAGAACGGCGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
TCTGTCTTGGACCGCGCCGGACGCGGCTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGCGGTACCATCACCATCACCATGGC  
AGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 29=FG9

GTGACACGGCGGTTAGAACGGCGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
TCTGTCTTGGACCGCGCCGGACGCGGCTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGCGGTACCATCACCATCACCATGGCAGC  
GGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 30=FG8

GTGACACGGCGGTTAGAACGGCGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG  
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
TCTGTCTTGGACCGCGCCGGACGCGGCTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

NTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGGCGGTACCATCACCATCACCATGGCAGCGGT  
TCTAGTCTAGCGGCCCACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 31=FG7

GTGACACGGCGGTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCCTGTTGACA  
ATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG  
GATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGTTTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCG  
TCTGTCTTGACCGCGCCGACGCGGCGTTCGACTCTTCTCTGATCCAGTACCAGGAATCTGAA  
AAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGTTCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTC  
TGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTC  
TAACCCGCTGTCTGCGATCTTACCACCGGCGGTACCATCACCATCACCATGGCAGCGGTTCT  
AGTCTAGCGGCCCACTGATCTTGGC

SEQ ID NO: 32=PSMw1 (N'-AviTag-HisTag-GS-Cyno PSMA\_ECD)

KSSSEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLHNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKE  
FGLDSVELTHYDVLVSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPAGYENVSDIVPPFAFSP  
QGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYKGVFRGNKVKNAQLAGATGVILYSD  
PDDYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGMAEAVGLPSIPV  
HPIGYYDAQKLEKMGGSASPDSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHSTSEVTRIYNV  
IGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGMLKKEGWRPRRTILFASWD  
AEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYNLTKELESPDE  
GFEGKSLYESWTKKSPSEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSYP  
LYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSVVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYNI  
SMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKFSERLRDFDKSNPILLRMMNDQLMFLERAFIDP  
LGLPDRPFYRHVIYAPSSHNYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSQAWGEVQRQISIAFTTVQAA  
AETLSEVA

SEQ ID NO: 33=PSMw8 (N'-AviTag-HisTag-GS-Chimp PSMA\_ECD)

KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKE  
FGLDSVELAHYDVLVSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPPGYENVLDIVPPFAFSP  
QGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYKGVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSD  
PADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRHGIAEAVGLPSIPV  
HPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNV  
IGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWD  
AEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYNLTKELEKSPDE  
GFEGKSLYESWTKKSPSEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYP  
LYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYNI  
SMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKFTEQLDFDKSNPILLRMMNDQLMFLERAFIDP

LGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGDVQRQISVAAFTVQAA  
AETLSEVA

SEQ ID NO: 34: гексагистидиновая метка

HHHHHH

SEQ ID NO: 35=P258AR6P1071\_G03

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 36=P258AR6P1070\_A05

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTIDEQRDWFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 37=P258AR6P1071\_F04

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWVIDEQRDWFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 38=P258AR6P1070\_F09

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTIDEQRDWFESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 39=P258AR6P1071\_D02

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWAIDEQRDWFESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 40=P229CR5P819\_H11

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWDIDEQRDWFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
LTGLKPGTEYTVSIYGVYHVYRSSNPLSAIFTT

SEQ ID NO: 41=P233FR9\_H10

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYWEWDDDDGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT

SEQ ID NO: 42=P233FR9P1001\_B5-5

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIGYWEWDDDDGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT

SEQ ID NO: 43=P233FR9P1001\_H3-1

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIGYWEWDDDDGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYHVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT

SEQ ID NO: 44=P233FR9P1001\_D9

LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIGYWEWDDDDGEAIVLTVPGSERSYDLT  
GLKPGTEYWVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT

SEQ ID NO: 45=P234CR9\_A07

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGEQFTIFDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT  
 GLKPGTEYTVSIYGASGYEWFHAFGSSNPLSAIFTT  
 SEQ ID NO: 46=P234CR9\_H01  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWEWWVIPGDFDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYD  
 LTGLKPGTEYTVSIYGVVNSGQWNDTSNPLSAIFTT  
 SEQ ID NO: 47=P233FR9\_H10 (cterm cys)  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYWEWDDDGAEIVLTVPGSERSYDLT  
 GLKPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTTC  
 SEQ ID NO: 48=P233FR9\_H10 (K62C)  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYWEWDDDGAEIVLTVPGSERSYDLT  
 GLCPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT  
 SEQ ID NO: 49=P233FR9\_H10 (E53C)  
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYWEWDDDGAEIVLTVPGSCRSYDLT  
 GLKPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT  
 SEQ ID NO: 50=P233FR9\_H10 (R11C)  
 LPAPKNLVVSCVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIGYWEWDDDGAEIVLTVPGSERSYDLT  
 GLKPGTEYPVYIAGVKGGQWSFPLSAIFTT  
 SEQ ID NO: 51=ненацеленный центирин (K62C)  
 LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLT  
 GLCPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTTGGHHHHHH  
 SEQ ID NO: 52=Сортаза А  
 MSHHHHHSSGENLYFQSKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDKKQQAQIP  
 KDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATREQLNRGVSFAEENESLDDQNIS IAGHTFIDRPNYQF  
 TNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRNVKPTAVEVLDEQKGDQKQLTLITCDDYNEETGVW  
 ETRKIFVATEVK  
 SEQ ID NO: 53=Сортаза А без метки  
 SKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDKKQQAQIPKDKSKVAGYIEIPDADI  
 KEPVYPGPATREQLNRGVSFAEENESLDDQNIS IAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVG  
 NETRKYKMTSIRNVKPTAVEVLDEQKGDQKQLTLITCDDYNEETGVWETRKIFVATEVK  
 SEQ ID NO: 54 Сайт расщепления протеазой из TEV  
 ENLYFQS  
 SEQ ID NO: 55 петля FG Tencon  
 KGGHRSN  
 SEQ ID NO: 56 Петля BC  
 DIDEQRDW  
 SEQ ID NO: 57 Петля BC

TIDEQRDW  
SEQ ID NO: 58 Петля BC  
VIDEQRDW  
SEQ ID NO: 59 Петля BC  
AIDEQRDW  
SEQ ID NO: 60 Петля BC  
EWWVIPGD  
SEQ ID NO: 61 Петля BC  
GEQFTI  
SEQ ID NO: 62 Петля BC  
TAPDAA  
SEQ ID NO: 63 Петля C  
FDSFLIQYQE  
SEQ ID NO: 64 Петля C  
FESFLIQYQE  
SEQ ID NO: 65 Петля C  
FDSFAIGYWE  
SEQ ID NO: 66 Петля C  
FDSFPIGYWE  
SEQ ID NO: 67 Петля C  
FDSFTIGYWE  
SEQ ID NO: 68 Петля CD  
SEKVGЕ  
SEQ ID NO: 69 Петля CD  
WDDDGE  
SEQ ID NO: 70 Петля F  
TEYTVSIYGV  
SEQ ID NO: 71 Петля F  
TEYTVSIYG  
SEQ ID NO: 72 Петля F  
TEYPVYIAGV  
SEQ ID NO: 73 Петля F  
TEYWVYIAGV  
SEQ ID NO: 74 Петля F  
TEYHVYIAGV  
SEQ ID NO: 75-140 приведены выше в таблицах

## SEQ ID NO: 141 полноразмерный PSMA яванского макака

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSSEATNITPKHNMK  
 AFLDELKAENIKKFLHNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELTHYDVLLSYPNKT  
 HPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPAGYENVSDIVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFK  
 LERDMKINCSGKIVVIARYGKVFGRNKVKNAQLAGATGVILYSDPDDYFAPGVKSYPDGWNLPGG  
 GVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGMAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSASP  
 DSSWRGSLKVPYVNGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTSEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRD  
 SWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGMLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLO  
 ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVYVNLTKELSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSEFS  
 GMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSSYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFK  
 YHLTVAQVRGGMVFELANSVLPFDICRDYAVVLRKYADKIYINISMKHPQEMKTYSVSFDSLFA  
 VKNFTEIASKFSERLRDFDKSNPILLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHYIYAPSSHNK  
 Y

>142 линкер

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA

>143 ECD человеческого PSMA

KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKE  
 FGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPPGYENVSDIVPPSAFSP  
 QGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVVIARYGKVFGRNKVKNAQLAGAKGVILYSD  
 PADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPV  
 HPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYVNGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNV  
 IGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWD  
 AEEFGLLGSTEWAEENSRLLOERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDE  
 GFEGKSLYESWTKKSPSEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYP  
 LYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDICRDYAVVLRKYADKIYSI  
 SMKHPQEMKTYSVSFDSLFAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPILVRMMNDQLMFLERAFIDP  
 LGLPDRPFYRHYIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVQRQIYVAFTVQAA  
 AETLSEVA

>144 FL человеческого PSMA с сигнальной последовательностью

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMK  
 AFLDELKAENIKKFLYNTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKT  
 HPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPPPGYENVSDIVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFK  
 LERDMKINCSGKIVVIARYGKVFGRNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGG  
 GVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPP  
 DSSWRGSLKVPYVNGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRD  
 SWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLO

ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPSPEFS  
GMPRI SKLGSNDFFVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETVELVEKFDPMFK  
YHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFA  
VKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNK  
YAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVQRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

>145 3-й домен FN3 тенасцина C

DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGN  
LKPDEYEVSLSIRRGDMSSNPAKETFTT

>146 Fibcon

LDAPTDLQVTNVTDTSITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPSSTSVTIT  
GLTPGVEYVVS LYALKDNQESPPLVGTQTT

>147 10-й домен FN3 фибронектина

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAVAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATI  
SGLKPGVDYITIVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT

>148

GSGS

>149

GGGSGGGG

>150

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG

>151

APAP

>152

APAPAPAPAP

>153

APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

>154

AP

>155 вариант альбумина

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESA  
ENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEVDVM  
CTAFHDNEETFLKKLYE IARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RD  
EGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG D LL  
ECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD V  
CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFK P  
LVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEA

KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF  
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEAE  
GKKLVAASQAALGL

>156 κДНК H10

CTGCCAGCCCCGAAGAATTTGGTCGTTTCCCGTGTCACTGAGGACTCTGCACGTCTGAG  
CTGGACCGCACCCGACCGCGGCGTTCGACAGCTTTGCAATCGGCTACTGGGAGTGGGATGATGAC  
GGCGAGGCCATTGTGCTGACCGTTCGGGTAGCGAGCGCAGCTACGATCTGACCGGTCTGAAGC  
CGGTACGGAATATCCGGTGTATATTGCGGGCGTGAAGGGTGGCCAGTGGAGCTTCCCGTGTGAG  
CGGATCTTTACCACC

>157 κДНК P258AR6P1071\_D02

CTGCCGGCTCCGAAAAACCTGGTCGTTTCCCGTGTCACTGAAGATTCTGCACGCTTGAG  
CTGGGCGATCGACGAGCAGCGTACTGGTTTGGAGAGCTTCTGTATTAGTATCAAGAATCGGAA  
AAAGTTGGCGAGGCCATCGTGTGACCGTTCGGGTAGCGAGCGCAGCTATGATCTGACGGGTC  
TGAAGCCAGGCACCGAGTATACGGTGTGAGCATTACGGTGTCTACCATGTGTACCGTAGCAATCC  
GCTGAGCGCGATCTTACCACC

>158 κДНК

P233FR9P1001\_H3-1

CTGCCAGCCCCGAAAAACTTAGTTGTCTCCCGGTGACCGAAGATTCTGCTCGTCTGAG  
CTGGACTGCACCGACCGCGGCGTTCGACAGCTTCCGATTGGCTACTGGGAGTGGGATGATGAC  
GGTGAAGCGATCGTGTGACCGTTCGGGTAGCGAGCGTAGCTATGACCTGACGGGTTTGAAC  
CTGGTACCGAGTATCACGTTTACATTTGCGGGCGTCAAGGGTGGCCAGTGGTCTTCCCGTGTGAG  
CGCAATCTTTACGACC

>159 эпитоп PSMA

KKSPSPEFSGMPRISK

>160 эпитоп PSMA

NWETNKF

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, связывающийся с человеческим простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA), содержащий

аминокислотную последовательность, на 89% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140, или

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 замен, причем замена представляет собой остаток цистеина по меньшей мере в одном положении остатка, соответствующем положениям остатков 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 62 SEQ ID NO: 41, или на С-конце пептида.

2. Полипептид, связывающийся с человеческим PSMA, по п.1, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

3. Полипептид, связывающийся с человеческим PSMA, по п.1, дополнительно содержащий метионин на N-конце полипептида.

4. Полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, содержащий аминокислотную последовательность, на 89% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35-140 или

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35-140, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 замен, причем замена представляет собой остаток цистеина по меньшей мере в одном положении остатка, соответствующем положениям остатков 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 62 SEQ ID NO: 41, или на С-конце пептида и

причем полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, конъюгирован со второй молекулой, которая представляет собой цитотоксический агент, поддающуюся обнаружению метку или полиэтиленгликоль.

5. Полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, по п.4, причем цитотоксический агент представляет собой ауристин, монометилауристин фенилаланин, долостатин, химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин или радиоактивный изотоп.

6. Полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, по п.4, причем поддающаяся обнаружению метка представляет собой радиоактивный изотоп, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентный краситель, R-фикоэритрин, электронно-плотный реагент, фермент, биотин, дигоксигенин или гаптен.

7. Полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, содержащий аминокислотную последовательность, на 89% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35-140 или

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35-140, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 замен, причем замена представляет собой остаток цистеина по меньшей мере в одном положении остатка, соответствующего положению остатков 6, 11, 22, 25, 26, 52, 53, 62 SEQ ID NO: 41, или на С-конце пептида; и

причем полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, конъюгирован с функциональной группой, увеличивающей период полужизни.

8. Полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, по п.7, в котором функциональная группа, увеличивающая период полужизни, представляет собой альбуминсвязывающую молекулу, полиэтиленгликоль (ПЭГ), альбумин, вариант альбумина или по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина.

9. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая полипептид, связывающийся с человеческим PSMA, по п.1 или 3 или полипептидный конъюгат, связывающийся с человеческим PSMA, по любому из пп.4-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ лечения пациента, имеющего рак, характеризующийся суперэкспрессией PSMA, который включает введение терапевтически эффективного количества полипептида, связывающегося с человеческим PSMA, по п.1 или 3 или полипептидного конъюгата, связывающегося с человеческим PSMA, по любому из пп.4-8, и фармацевтически приемлемого носителя пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

11. Способ по п.10, в котором рак представляет собой солидную опухоль, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого или рак почки.

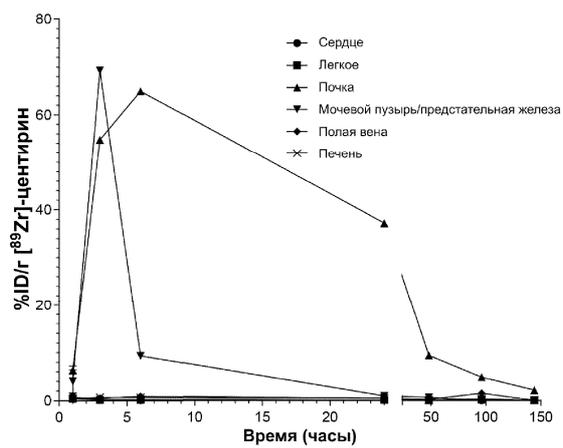
12. Применение полипептида, связывающегося с человеческим PSMA, по п.1 или 3 или полипептидного конъюгата, связывающегося с человеческим PSMA, по пп.4-8 в качестве агента для диагностики рака.

13. Применение по п.12, в котором полипептид, связывающийся с человеческим PSMA, дополнительно содержит модифицированный цистеин, конъюгированный с R-фикоэритрином (PE).

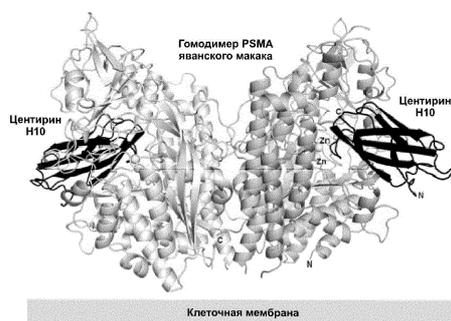
14. Способ обнаружения PSMA-экспрессирующих клеток в биологической пробе, включающий обработку биологической пробы полипептидным конъюгатом, связывающимся с человеческим PSMA, по п.6 и определение того, содержит ли биологическая проба PSMA-экспрессирующие клетки, путем обнаружения связывания полипептида с PSMA-экспрессирующими клетками в пробе, причем обнаружение связывания полипептида с PSMA-экспрессирующими клетками в пробе детектирует PSMA-экспрессирующие клетки в биологической пробе.

15. Способ по п.14, в котором PSMA-экспрессирующие клетки представляют собой PSMA-экспрессирующие опухолевые клетки.

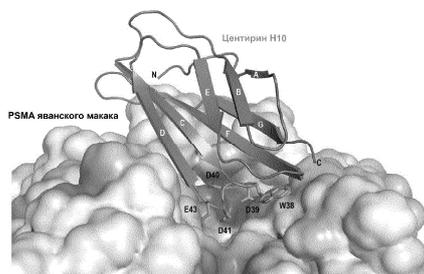
16. Способ доставки полипептида в PSMA-экспрессирующие опухолевые клетки, включающий введение полипептида по п.1 или 3 или полипептидного конъюгата, связывающегося с человеческим PSMA, по любому из пп.4-8 пациенту, имеющему PSMA-экспрессирующие опухолевые клетки.



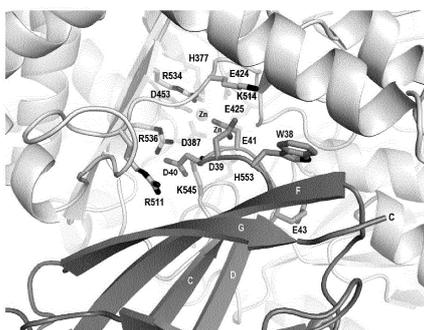
Фиг. 1



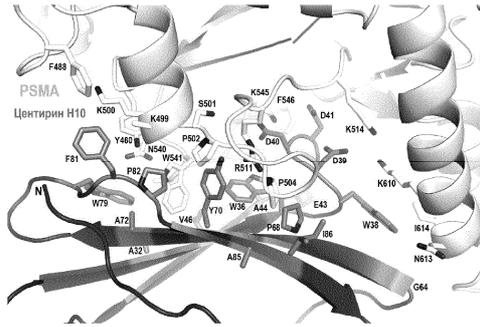
Фиг. 2А



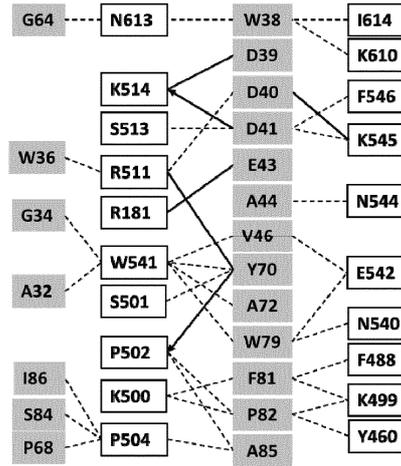
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 3А



Фиг. 3В

```

h KSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLA
c KSSSEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLA

h KQIQSQWKPEGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSL
c KQIQSQWKPEGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSL

h FEPPPPGYENVSDIVPPFAFSPQGMPEGLVYVNYARTEDEFFKLERDMK
c FEPPPPGYENVSDIVPPFAFSPQGMPEGLVYVNYARTEDEFFKLERDMK

h INCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPDYFAPGVKSYP
c INCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGATGVILYSDPDYFAPGVKSYP

h DGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGTAEAVGLPSIP
c DGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGMABAVGLPSIP

h VHPIGYYDAQKLEKMGSAEPDSSWRGSLKVPYVNGPGFTGNFSTQKVK
c VHPIGYYDAQKLEKMGSAEPDSSWRGSLKVPYVNGPGFTGNFSTQKVK

h MHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAA
c MHIHSTSEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAA

h VVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQ
c VVHEIVRSFGMLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQ

h ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCPTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSL
c ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCPTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSL

h YESWIKKSPSEFFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEI
c YESWIKKSPSEFFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEI

h NKFSYPLYHSVYETVELVEKFDYDPMFKYHLTVAQVRGGMVPELANSIVL
c NKFSYPLYHSVYETVELVEKFDYDPMFKYHLTVAQVRGGMVPELANSIVL

h PFDICRDYAVVLRKYADKLYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIA
c PFDICRDYAVVLRKYADKLYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIA

h SKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIA
c SKFSERLRDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIA

h PSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKKRQIYVAFTVQAAA
c PSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKKRQIYVAFTVQAAA

h ETLSEVA
c ETLSEVA
    
```

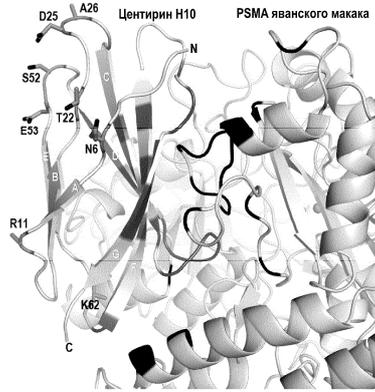
Фиг. 4А

1  
 LPAPK<sup>1</sup>NLVVSRVTE<sup>2</sup>DSARLSWTAPDAAFDSFAI<sup>3</sup>GYWE<sup>4</sup>WDDG<sup>5</sup>GEAIVL<sup>6</sup>TVP

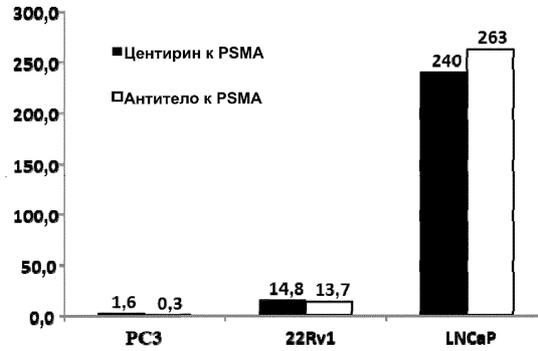
50

51  
 GSERSYDLTGLKPK<sup>52</sup>GTEY<sup>53</sup>PVYI<sup>54</sup>AGVKG<sup>55</sup>QW<sup>56</sup>SF<sup>57</sup>PLSA<sup>58</sup>IF<sup>59</sup>TT

Фиг. 4В

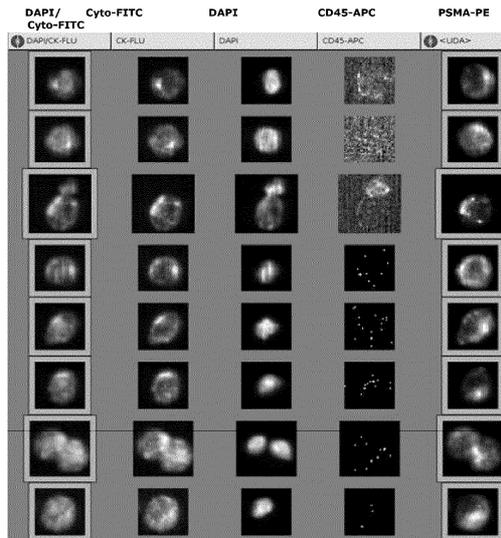


Фиг. 5



Фиг. 6

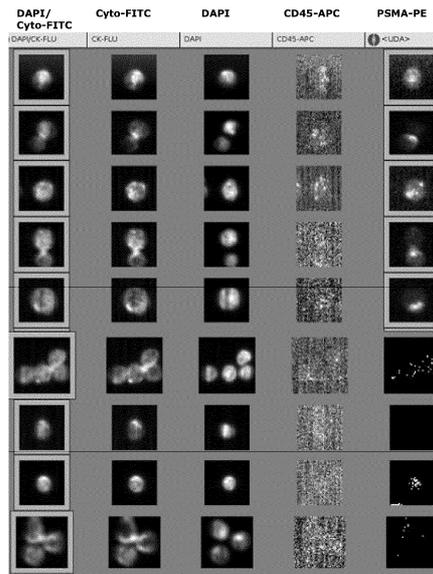
A. LNCaP (клеточная линия с высокой экспрессией PSMA)



100% клеток являются положительными по PSMA

Фиг. 7А

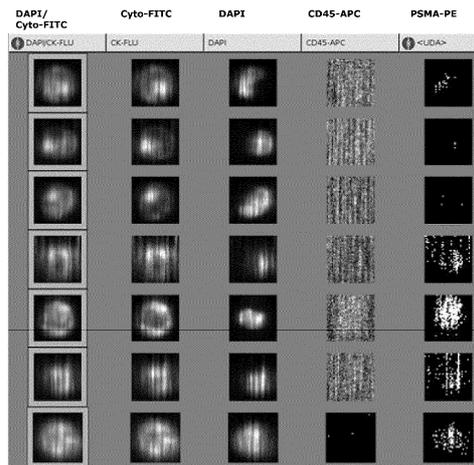
**В. 22RV1 (клеточная линия с низкой экспрессией PSMA)**



26% клеток являются положительными по PSMA

Фиг. 7В

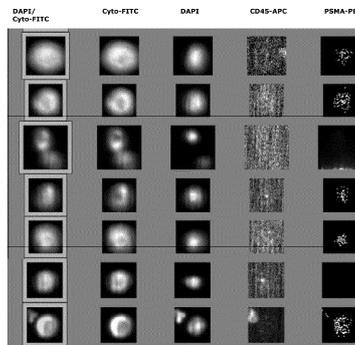
**С. РС3 (PSMA-отрицательная клеточная линия)**



0% клеток являются положительными по PSMA

Фиг. 7С

**Д. SKBR3 (PSMA-отрицательная клеточная линия)**



0% клеток являются положительными по PSMA

Фиг. 7Д

