(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202200143 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.31

(22) Дата подачи заявки
2015.10.14

(51) Int. Cl. ***C12N 9/78*** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ-2 (АДА-2), ИХ ВАРИАНТЫ И СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) **62/063,936**
(32) **2014.10.14**
(33) **US**
(62) **201700181; 2015.10.14**

(71) Заявитель:
ГАЛОЗИМ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Тсанос Кристофер Деннис, Ванг Лин, Шепард Гарольд Майкл (US)

(74) Представитель:
Стояченко И.Л. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены варианты белка аденозиндезаминаза 2 (ADA2). Также предусмотрены конъюгаты и композиции ADA2, содержащие белок или конъюгат ADA2. Также предусмотрены способы и применения белков или конъюгатов ADA2 для лечения заболеваний и состояний, таких как опухоль или рак, и, в частности, любого заболевания или состояния, связанного с повышенным аденозином или другим ассоциированным маркером.

202200143 A1

202200143 A1

КОМПОЗИЦИИ АДЕНОЗИНДЕАМИНАЗЫ-2 (ADA2), ИХ ВАРИАНТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Заявка претендует на приоритет предварительной заявки США номер 62/063,936, поданной 14 октября 2014, авторы Christopher Thanos, Lin Wang и H. Michael Shepard, озаглавленной КОМПОЗИЦИИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ-2 (ADA2), ИХ ВАРИАНТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ. В допустимых случаях предмет этой заявки включен посредством ссылки во всей своей полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Электронная версия перечня последовательностей подана с этой заявкой, и его содержание включено посредством ссылки во всей своей полноте. Электронный файл создан 14 октября 2015, имеет размер 3177 килобайт и называется 3121seqPC1.txt.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Предусмотрены варианты белка аденозиндезаминазы 2 (ADA2). Также предусмотрены конъюгаты и композиции ADA2, содержащие белок ADA2 или конъюгат ADA2. Также предусмотрены способы и применения белков или конъюгатов ADA2 для лечения заболеваний и состояний, таких как опухоль или рак, и, в частности, любого заболевания или состояния, связанного с повышенным уровнем аденозина или другим ассоциированным маркером.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аденозин широко известен как эффектор иммунной функции. В Т-клетках аденозин уменьшает индуцированную Т-клеточным рецептором активацию NF-κB и ингибирует IL-2, IL-4 и IFN-γ. Аденозин уменьшает цитотоксичность Т-клеток, увеличивает анергию Т-клеток и увеличивает дифференциацию Т-клеток в Fop3+ или Lag-3+ регуляторные (T-reg) Т-клетки. Известно, что в NK клетках аденозин уменьшает продукцию IFN-γ и супрессирует цитотоксичность NK клеток. Известно, что аденозин блокирует адгезию и экстравазацию нейтрофилов, уменьшает фагоцитоз и уменьшает

уровни супероксида и оксида азота. Аденозин также уменьшает экспрессию TNF-α, IL-12 и MIP-1α на макрофагах, снижает экспрессию MHC класса II и увеличивает уровни IL-10 и IL-6. Кроме того, аденозин уменьшает фагоцитоз и уровни супероксида и оксида азота в макрофагах. Поскольку аденозин обладает этими и другими активностями, связанными с иммунитетом, аберрантные или повышенные уровни аденозина ассоциированы с рядом заболеваний и состояний, включая те, в которых ключевую роль играют опосредованные аденозином иммуносупрессирующие эффекты. Следовательно, существует необходимость в лечении таких заболевания и состояний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предусмотрены варианты белка аденозиндезаминазы 2 (ADA2) или его каталитически активных частей, которые содержат модификацию (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного белка ADA2 или его каталитически активной части. В некоторых вариантах воплощения, немодифицированный белок ADA2 может включать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или может представлять собой его каталитически активную часть; аминокислотная модификация (аминокислотные модификации) выбрана из аминокислотной замены (аминокислотных замен), делеции (делеций) и вставки (вставок); и вариант ADA2, когда находится в форме димера (димерной форме), может обладать одним или несколькими свойствами, выбранными из: увеличенной активности аденозиндезаминазы, пониженного связывания с гепарином, увеличенного времени полужизни в сыворотке крови, измененного оптимума pH, увеличенной термостабильности, измененного связывания с рецептором и гипергликозилирования по сравнению с соответствующей димерной формой немодифицированного белка ADA2. Предусмотрены разнообразные аминокислотные модификации, включая замены, делеции и вставки. Понятно, что отдельные модификации, которые придают определенную активность или свойство, могут комбинироваться; поскольку в белках эффекты мутаций или модификаций обычно являются

аддитивными. Любой вариант ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренный в настоящем документе, содержащий модификации, включая замены, делеции и вставки, и нуклеиновые кислоты, кодирующие вариант ADA2 или его каталитически активную часть, могут быть использованы в любых способах, композициях, конъюгатах, модифицированных формах, векторах, клетках, комбинациях, применениях и композициях для применения и комбинациях для применения, предусмотреных в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть, когда находится в форме димера, обладает увеличенной активностью аденозиндезаминазы или увеличенной активностью аденозиндезаминазы и пониженным связыванием с гепарином.

В некоторых вариантах воплощения, немодифицированный белок ADA2 представляет собой гомодимер, и мономерная форма включает последовательность аминокислотных остатков, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 представляет собой каталитически активную часть варианта белка ADA2, как предусмотрено в настоящем документе, где немодифицированный белок ADA2 представляет собой гомодимер соответствующих каталитически активных частей полипептида, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 5, где соответствующие части определены путем выравнивания.

В некоторых вариантах воплощения, белок ADA2 или его каталитически активная часть не содержат модификацию, выбранную из аминокислотной замены, соответствующей H7R, G18A, G18R, G18V, I64T, A80D, H83Q, V90A, C108G, A120V, H121R, W133G, R125C, R140Q, K141R, R142W, P164L, P222L, W235S, H306R, E330G, W333G, V365L, Y424C, F464S, или делеции, соответствующей R8-K14del→-- , с нумерацией со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, немодифицированный белок ADA2 может включать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или может

представлять собой его каталитически активную часть. Например, немодифицированный белок ADA2 имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или с его соответствующей каталитически активной частью. Например, немодифицированный белок ADA2 включает последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или может представлять собой его каталитически активную часть, или немодифицированный белок ADA2 имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 и 380-383, или может представлять собой его каталитически активную часть. В конкретных вариантах воплощения, немодифицированный белок ADA2 включает последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или может представлять собой его каталитически активную часть.

В некоторых вариантах воплощения, каталитически активная часть белка ADA2 может представлять собой белок ADA2, у которого отсутствует весь предполагаемый домен связывания с рецептором или его часть (PRB). Например, каталитически активная часть белка ADA2 может включать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 548-550. В некоторых вариантах воплощения, каталитически активная часть немодифицированного белка ADA2 имеет последовательность, приведенную в виде остатков 77-473 белка, приведенного в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или больше аминокислотных модификаций по сравнению с немодифицированным белком ADA2. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 включает до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 не содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 или 374-383, или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах воплощения, первичная аминокислотная

последовательность варианта белка ADA2 не является последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 или 374-383.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, обладает активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин. В некоторых вариантах воплощения в настоящем документе вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 6 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 7 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 8 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 9 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 1 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 2 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 3 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 4 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 5 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 6 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 7 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 8 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 9 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 1 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 2 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 3 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 4 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 5 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$ или больше.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать термостабильностью с температурой плавления (Tm) равной, по меньшей мере, 58°C. Например, Tm белка ADA2 составляет, по меньшей мере, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C или больше.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может содержать модификацию (модификации), которая представляет собой аминокислотную замену (аминокислотные замены); и вариант белка ADA2 включает одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, аминокислотная замена (аминокислотные замены) представляют собой положения, соответствующие аминокислотным остаткам 11, 20, 219, 221, 262, 264, 366, 371, 372 или 452, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E,

R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из замен, соответствующих H264A; H264Q; H264N; H264G; R219K; R219Q; R219N; R219A; L221A; L221V; L221G; E179D; E179A; E179S; E179T; E179V; E179G; S262A; S262V; S262M; S262N; D86A; D86C; D86E; D86F; D86G; D86H; D86I; D86K; D86L; D86M; D86N; D86P; D86Q; D86R; D86S; D86T; D86V; D86W; D86Y; E179C; E179F; E179H; E179I; E179K; E179L; E179M; E179N; E179P; E179Q; E179R; E179W; E179Y; R219C; R219D; R219E; R219F; R219G; R219H; R219I; R219L; R219M; R219P; R219S; R219T;

R219V; R219W; R219Y; L221C; L221D; L221E; L221F; L221H; L221I; L221K; L221M; L221N; L221P; L221Q; L221R; L221S; L221T; L221W; L221Y; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262K; S262L; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262W; S262Y; H264C; H264D; H264E; H264F; H264I; H264K; H264L; H264M; H264P; H264R; H264S; H264T; H264V; H264W; H264Y; S266A; S266C; S266D; S266E; S266F; S266G; S266H; S266I; S266K; S266L; S266M; S266N; S266P; S266Q; S266R; S266T; S266V; S266W; S266Y; K267A; K267C; K267D; K267E; K267F; K267G; K267H; K267I; K267L; K267M; K267N; K267P; K267Q; K267R; K267S; K267T; K267V; K267W; K267Y; V296A; V296C; V296D; V296E; V296F; V296G; V296H; V296I; V296K; V296L; V296M; V296N; V296P; V296Q; V296R; V296S; V296T; V296W; и V296Y.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 содержит аминокислотную замену в одном из положений или в обоих положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 219 и 262, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат замену, соответствующую S262N или S262Q. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 содержит замену, соответствующую S262N. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 содержит замену, соответствующую R219K, R219Q, R219N или R219A. В других вариантах воплощения, вариант ADA2 содержит замену, соответствующую R219Q или замены R219Q/R20E. В других вариантах воплощения, вариант ADA2 содержит замену, соответствующую R219Q/S262N. Например, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификацию (модификации), выбранные из любой R219Q/S262N/--→N1/--→A2/--→S3, R219Q/S262N/R20N/V22S, R219Q/S262N/K371N/D373S, R219Q/S262N/K372N/I374S, R219Q/S262N/T403N/H405S, R219Q/S262N/G404N/P406S, R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{7}$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{5}$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{3}$, R219Q/S262N/R125N/P126A, R219Q/S262N/S127N/K129S, R219Q/S262N/P126N/E128T, R219Q/S262N/R112N/I114T,

R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T, R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T, R219Q/S262N/R142N/Q144S, R219Q/S262N/E137N/Y139T, R219Q/S262N/P111N/G113S, R219Q/S262N/F119S, R219Q/S262N/F119K, R219Q/S262N/Y224R, R219Q/S262N/Y224N, R219Q/S262N/Y191S, R219Q/S262N/Y191D, R219Q/S262N/F183K, R219Q/S262N/Y191D/Y224R, R219Q/S262N/F109S, R219Q/S262N/F109A, R219Q/S262N/R118D, R219Q/S262N/R118A, R219Q/S262N/Y139T, R219Q/S262N/Y139A, R219Q/S262N/W133S, R219Q/S262N/W133T, R219Q/S262N/P124A, R219Q/S262N/P124S, R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$, R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$, R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$, R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n, R219Q/S262N/K11A, R219Q/S262N/K11D, R219Q/S262N/K11E, R219Q/S262N/K13A, R219Q/S262N/K13D, R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, R219Q/S262N/N98-N156del, R219Q/S262N/C105-E148del, R219Q/S262N/C105-T147del, R219Q/S262N/V99-Q144del, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$, R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, R219Q/S262N/K371D/N98-N156del, R219Q/S262N/K371D/C105-E148del, R219Q/S262N/K371D/C105-T147del, R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del, R219Q/S262N/K13E, R219Q/S262N/K371A, R219Q/S262N/K372A, R219Q/S262N/K372D, R219Q/S262N/K372E, R219Q/S262N/K452A, R219Q/S262N/K452D, R219Q/S262N/K452E, R219Q/S262N/R20A, R219Q/S262N/R20D,

R219Q/S262N/R366A, R219Q/S262N/R366D, R219Q/S262N/R366E, R219Q/S262N/H264A, R219Q/S262N/H264Q, R219Q/S262N/H264N, R219Q/S262N/H264G, R219K/S262N, R219N/S262N, R219A/S262N, R219Q/S262N/L221A, R219Q/S262N/L221V, R219Q/S262N/L221G, R219Q/S262N/E179D, R219Q/S262N/E179A, R219Q/S262N/E179S, R219Q/S262N/E179T, R219Q/S262N/E179V, R219Q/S262N/E179G, R219Q/S262A, R219Q/S262V, R219Q/S262M, R219Q/S262N/K11A/R20A, R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A, R219Q/S262N/R20A/K371A, R219Q/S262N/K11A/K371A, R219Q/S262N/K26A, R219Q/S262N/K26D, R219Q/S262N/K26E, R219Q/S262N/R217A, R219Q/S262N/R217D, R219Q/S262N/R217E, R219Q/S262N/K258A, R219Q/S262N/K258D, R219Q/S262N/K258E, R219Q/S262N/R277A, R219Q/S262N/R277D, R219Q/S262N/R277E, R219Q/S262N/R283A, R219Q/S262N/R283D, R219Q/S262N/R283E, R219Q/S262N/K309A, R219Q/S262N/K309D, R219Q/S262N/K309E, R219Q/S262N/K317A, R219Q/S262N/K317D, R219Q/S262N/K317E, R219Q/S262N/K321A, R219Q/S262N/K321D, R219Q/S262N/K321E, R219Q/S262N/R352A, R219Q/S262N/R352D, R219Q/S262N/R352E, R219Q/S262N/R441A, R219Q/S262N/R441D, R219Q/S262N/R441E, R219Q/S262N/K444A, R219Q/S262N/K444D, R219Q/S262N/K444E, R219Q/S262N/K461A, R219Q/S262N/K461D, R219Q/S262N/K461E, R219Q/S262N/K469A, R219Q/S262N/K469D, R219Q/S262N/K469E, R219Q/S262N/K470A, R219Q/S262N/K470D, R219Q/S262N/K470E, R219Q/S262N/D86A, R219Q/S262N/D86C, R219Q/S262N/D86E, R219Q/S262N/D86F, R219Q/S262N/D86G, R219Q/S262N/D86H, R219Q/S262N/D86I, R219Q/S262N/D86K, R219Q/S262N/D86L, R219Q/S262N/D86M, R219Q/S262N/D86N, R219Q/S262N/D86P, R219Q/S262N/D86Q, R219Q/S262N/D86R, R219Q/S262N/D86S, R219Q/S262N/D86T, R219Q/S262N/D86V, R219Q/S262N/D86W, R219Q/S262N/D86Y, R219Q/S262N/E179C, R219Q/S262N/E179F, R219Q/S262N/E179H, R219Q/S262N/E179I, R219Q/S262N/E179K, R219Q/S262N/E179L, R219Q/S262N/E179M, R219Q/S262N/E179N, R219Q/S262N/E179P,, R219Q/S262N/E179Q,

R219Q/S262N/E179R, R219Q/S262N/E179W, R219Q/S262N/E179Y, R219C/S262N, R219D/S262N, R219E/S262N, R219F/S262N, R219G/S262N, R219H/S262N, R219I/S262N, R219L/S262N, R219M/S262N, R219P/S262N, R219S/S262N, R219T/S262N, R219V/S262N, R219W/S262N, R219Y/S262N, R219Q/S262N/L221C, R219Q/S262N/L221D, R219Q/S262N/L221E, R219Q/S262N/L221F,R219Q/S262N/L221H,R219Q/S262N/L221I, R219Q/S262N/L221K, R219Q/S262N/L221M, R219Q/S262N/L221N, R219Q/S262N/L221P, R219Q/S262N/L221Q, R219Q/S262N/L221R, R219Q/S262N/L221S, R219Q/S262N/L221T, R219Q/S262N/L221W, R219Q/S262N/L221Y, R219Q/S262C, R219Q/S262D, R219Q/S262E, R219Q/S262F, R219Q/S262G, R219Q/S262H, R219Q/S262I, R219Q/S262K, R219Q/S262L, R219Q/S262P, R219Q/S262Q, R219Q/S262R, R219Q/S262T, R219Q/S262W, R219Q/S262Y, R219Q/S262N/H264C, R219Q/S262N/H264D, R219Q/S262N/H264E, R219Q/S262N/H264F, R219Q/S262N/H264I, R219Q/S262N/H264K, R219Q/S262N/H264L, R219Q/S262N/H264M, R219Q/S262N/H264P, R219Q/S262N/H264R, R219Q/S262N/H264S, R219Q/S262N/H264T, R219Q/S262N/H264V, R219Q/S262N/H264W, R219Q/S262N/H264Y, R219Q/S262N/S266A, R219Q/S262N/S266C, R219Q/S262N/S266D, R219Q/S262N/S266E, R219Q/S262N/S266F, R219Q/S262N/S266G, R219Q/S262N/S266H, R219Q/S262N/S266I, R219Q/S262N/S266K, R219Q/S262N/S266L, R219Q/S262N/S266M, R219Q/S262N/S266N, R219Q/S262N/S266P, R219Q/S262N/S266Q, R219Q/S262N/S266R, R219Q/S262N/S266T, R219Q/S262N/S266V, R219Q/S262N/S266W, R219Q/S262N/S266Y, R219Q/S262N/K267A, R219Q/S262N/K267C, R219Q/S262N/K267D, R219Q/S262N/K267E, R219Q/S262N/K267F, R219Q/S262N/K267G, R219Q/S262N/K267H, R219Q/S262N/K267I, R219Q/S262N/K267L, R219Q/S262N/K267M, R219Q/S262N/K267N, R219Q/S262N/K267P, R219Q/S262N/K267Q, R219Q/S262N/K267R, R219Q/S262N/K267S, R219Q/S262N/K267T, R219Q/S262N/K267V, R219Q/S262N/K267W, R219Q/S262N/K267Y, R219Q/S262N/V296A, R219Q/S262N/V296C, R219Q/S262N/V296D, R219Q/S262N/V296E, R219Q/S262N/V296F, R219Q/S262N/V296G,

R219Q/S262N/V296H, R219Q/S262N/V296I, R219Q/S262N/V296K, R219Q/S262N/V296L, R219Q/S262N/V296M, R219Q/S262N/V296N, R219Q/S262N/V296P, R219Q/S262N/V296Q, R219Q/S262N/V296R,, R219Q/S262N/V296S, R219Q/S262N/V296T, R219Q/S262N/V296W и R219Q/S262N/V296Y. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 включает модификации, выбранные из R219Q/K11A/R20A, R219Q/K11A/R20A/K371A, R219Q/R20A/K371A, 219Q/K11A/K371A, S262N/K11A/R20A, S262N/K11A/R20A/K371A, S262N/R20A/K371A, S262N/K11A/K371A, R219Q/C105-T147del→(Gly)n, R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n, R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n, R219Q/N98-N156del, R219Q/C105-E148del, R219Q/C105-T147del, R219Q/V99-Q144del, S262N/C105-T147del→(Gly)n, S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, S262N/N98-N156del, S262N/C105-E148del, S262N/C105-T147del и S262N/V99-Q144del.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать увеличенной активностью аденозиндезаминазы. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать, по меньшей мере, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% или больше от активности соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2, где активность аденозиндезаминазы оценивают при одних и тех же условиях. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), которая выше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 2,2 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз или больше, чем каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2, где каталитическую эффективность активности аденозиндезаминазы оценивают при одних и тех же условиях. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей

мере, или, по меньшей мере, примерно 2 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 3 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 6 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 7 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 8 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 9 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 1 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 2 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 3 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^5 M^{-1} c^{-1} или больше.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификации, выбранные из K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$, R219Q/S262N/--→N1/--→A2/--→S3, K371D/C105-T147del→(Gly)n, K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$, K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$, K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$, K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$, K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$, K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, K371D/N98-N156del, K371D/C105-E148del, K371D/C105-T147del и K371D/V99-Q144del. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификации, выбранные из R125N/P126A, S127N/K129S, P126N/E128T, R112N/I114T, I134N/L135C/L136T, I134N/L135S/L136T, R142N/Q144S, E137N/Y139T, P111N/G113S, F119S, F119K, Y224R, Y224N, Y191S, Y191D, F183K, Y191D/Y224R, F109S, F109A, R118D, R118A, Y139T, Y139A, W133S, W133T, P124A, P124S, V99-Q144del, V99-Q144del→(GGGGS)n, C105-T147del→(GGGGS)n, V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, C105-T147del→$(GGGGS)_1$, C105-T147del→$(GGGGS)_2$ и C105-T147del→$(GGGGS)_3$.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификации, выбранные из R125N/P126A, S127N/K129S, P126N/E128T, R112N/I114T, I134N/L135C/L136T, I134N/L135S/L136T, R142N/Q144S, E137N/Y139T, P111N/G113S, F119S, F119K, Y224R, Y224N, Y191S, Y191D, F183K, Y191D/Y224R, F109S, F109A, R118D, R118A, Y139T, Y139A, W133S, W133T, P124A, P124S, V99-Q144del, V99-Q144del→(GGGGS)n, C105-T147del→(GGGGS)n, V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, C105-T147del→$(GGGGS)_1$, C105-T147del→$(GGGGS)_2$ и C105-T147del→$(GGGGS)_3$.

Например, среди таких вариантов белка ADA2 предусмотрены любые, которые включают одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 20, 219, 221, 262, 264, 366, 371, 372 или 452, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11E, R20A, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366E, K371A, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D и K452E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать аминокислотные замены, выбранные из K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E и R219Q/S262N, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать пониженным связыванием с гепарином. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать не более 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% от связывания гепарина соответствующей димерной формой немодифицированного белка ADA2, где связывание гепарина оценивают при одних и тех же условиях.

Например, среди таких вариантов белка ADA2 предусмотрены любые, которые включают одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 20, 262, 366, 371, 372 или 452, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из R20A, R20D, R20E, S262N, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E и

K452E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать аминокислотные замены, выбранные из K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D и S262N/R20E/K371E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат одну или несколько аминокислотных замен, соответствующих K11A; K11D; K11E; K13A; K13D; K13E; K371A; K371D; K371E; K372A; K372D; K372E; K452A; K452D; K452E; R20A; R20D; R20E; R366A; R366D; R366E; K26A; K26D; K26E; R217A; R217D; R217E; K258A; K258D; K258E; R277A; R277D; R277E; R283A; R283D; R283E; K309A; K309D; K309E; K317A; K317D; K317E; K321A; K321D; K321E; R352A; R352D; R352E; R441A; R441D; R441E; K444A; K444D; K444E; K461A; K461D; K461E; K469A; K469D; K469E; K470A; K470D; и K470E.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать увеличенным временем полужизни в сыворотке крови ($t_{1/2}$). Например, вариант ADA2, когда находится в форме димера, может обладать временем полужизни, которое составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% или больше времени полужизни соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2, где время полужизни оценивают при одних и тех же условиях.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать увеличенной термостабильностью. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать термостабильностью с температурой плавления (Tm), которая, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно, на 0,5°C, 1,0°C, 2,0°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C, 6,0°C, 7,0°C, 8,0°C, 9,0°C, 10,0°C или больше превышает Tm соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2, где Tm оценивают при одних и тех же условиях. Например, вариант белка ADA2 имеет

температуру плавления (Tm), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно, 67,6°C, 67,8°C, 68,0°C, 68,2°C, 68,4°C, 68,6°C, 68,8°C, 69,0°C, 69,2°C, 69,4°C, 69,6°C, 69,8°C, 70,0°C, 70,2°C, 70,4°C, 70,6°C, 70,8°C, 71,0°C, 71,2°C, 71,4°C, 71,6°C, 71,8°C или выше.

В примерах любых вариантов белка ADA2, предусмотренных в настоящем документе, активность аденозиндезаминазы варианта белка ADA2 можно оценить или обнаружить при или примерно при pH 6,5 ± 0,2. В некоторых примерах, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может иметь измененный оптимум pH для активности аденозиндезаминазы. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может иметь оптимум pH для активности аденозиндезаминазы, который выше, чем оптимум pH соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может иметь оптимум pH с pH, равным, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или выше. В других примерах, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может иметь оптимум pH для активности аденозиндезаминазы, который ниже, чем оптимум pH соответствующей димерной формы немодифицированного белка ADA2. Например, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может иметь оптимум pH с pH меньше чем или меньше чем примерно 6,5, 6,4, 6,3, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0 или меньше.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать модификацию одной или нескольких аминокислот в предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB), где модификация представляет собой аминокислотную делецию, вставку или замену. В любом из таких примеров вариант белка ADA2 не содержит модификацию, которая представляет собой аминокислотную замену, соответствующую аминокислотной замене C108G, A120V, H121R, R125C, R140Q, K141R или R142W, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, у варианта белка ADA2 или его каталитически активной части отсутствует весь предполагаемый домен связывания с рецептором или его часть (PRB), или они имеют модификацию

PRB, при этом снижается или исчезает любая активность связывания с рецептором или фактором роста, или снижается или исчезает другая активность ADA2, отличная от активности дезаминазы, или ослабляется или утрачивается взаимодействие с доменом ADA, и PRB домен соответствует остаткам 98-156, приведенным в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, у варианта ADA2 отсутствуют остатки 105-148, или с 105 по 147, или с 99 по 144, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых примерах, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 548-550 и 579. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат делецию всего PRB домена или части PRB домена и необязательно вставку пептидного линкера.

В некоторых примерах, вариант белка ADA2 может иметь делецию одного или нескольких смежных аминокислотных остатков, соответствующих любому одному или нескольким смежным аминокислотным остаткам между или примерно между аминокислотными остатками 98 и 156 или аминокислотными остатками 105 и 148, включительно, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В любых таких примерах, вариант полипептида ADA2 может также включать замену удаленной области на пептидный линкер. Например, пептидный линкер может быть выбран из (Gly)n (SEQ ID NO:368), где n представляет собой число от 2 до 20; (GGGGS)n (SEQ ID NO:343), где n представляет собой число от 1 до 6; (SSSSG)n (SEQ ID NO:344), где n представляет собой число от 1 до 6; (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), где n представляет собой число от 1 до 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); и EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349). Например, пептидный линкер может быть выбран из GGG (SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); и GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372).

В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 может содержать вариант полипептида ADA2, который может включать модификацию в PRB

домене, которая соответствует C105-T147del→$(Gly)_n$, где n представляет собой число от 2 до 20, например, C105-T147del→$(Gly)_{15}$, C105-T147del→$(Gly)_{10}$, C105-T147del→$(Gly)_7$, C105-T147del→$(Gly)_5$ или C105-T147del→$(Gly)_3$, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 может включать модификацию в PRB домене, которая соответствует C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; C105-T147del→$(Gly)_{15}$; C105-T147del→$(Gly)_{10}$; C105-T147del→$(Gly)_7$; C105-T147del→$(Gly)_5$; C105-T147del→$(Gly)_3$; N98-N156del; C105-E148del; C105-T147del; V99-Q144del; V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; C105-T147del→$(GGGGS)_1$; C105-T147del→$(GGGGS)_2$; и C105-T147del→$(GGGGS)_3$, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из замен, соответствующих F119S; F119K; Y224R; Y224N; Y191S; Y191D; F183K; Y191D/Y224R; F109S; F109A; R118D; R118A; Y139T; Y139A; W133S; W133T; P124A; и P124S, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат аминокислотные замены, выбранные из замен, соответствующих R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; и R219Q/S262N/P124S. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 содержит модификации, выбранные из K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/C105-

T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; K371D/N98-N156del; K371D/C105-E148del; K371D/C105-T147del; K371D/V99-Q144del; R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/N98-N156del; R219Q/S262N/C105-E148del; R219Q/S262N/C105-T147del; R219Q/S262N/V99-Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/K371D/N98-N156del; R219Q/S262N/K371D/C105-E148del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del; R219Q/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/N98-N156del; R219Q/C105-E148del; R219Q/C105-T147del; R219Q/V99-Q144del; S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; S262N/C105-

T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; S262N/N98-N156del; и S262N/C105-E148del; S262N/C105-T147del; и S262N/V99-Q144del.

В некоторых вариантах воплощения варианта белка ADA2, включая примеры, содержащие модифицированный PRB домен, вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать пониженным связыванием с любым одним или несколькими аденозиновыми рецепторами (ADR), выбранными из A_1, A_{2A}, A_{2B} и A_3, по сравнению со связыванием немодифицированного белка ADA2 с тем же самым рецептором, которое оценивают при одних и тех же условиях. Например, связывание варианта белка ADA2 снижено, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 0,5 раза, 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или больше.

В некоторых вариантах воплощения варианта ADA2, предусмотренного в настоящем документе, вариант ADA2 может быть гликозилирован, например, по нативным или не нативным сайтам гликозилирования. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может включать модификацию (модификации), которые изменяют гликозилирование за счет введения не нативных сайтов гликозилирования, при этом, в случае экспрессии в клетке, способной осуществлять гликозилирование, вариант белка ADA2 является гипергликозилированным по сравнению с немодифицированным полипептидом ADA2. Например, не нативный сайи глкиозилирования вводится путем аминокислотной замены (аминокислотных замен) или вставки одной, двух или трех аминокислот. Например, модификации выбраны из модификаций, соответствующих ---→N1/---→A2/---→S3, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S и G404N/P406S, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификации, соответствующие R219Q/S262N/---→N1/---→A2/---→S3; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; или R219Q/S262N/G404N/P406S. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат модификацию в

предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB), соответствующую одной или нескольким модификациям, выбранным из: R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; и P111N/G113S. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат аминокислотные замены, соответствующие R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; или R219Q/S262N/P111N/G113S.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может представлять собой человеческий ADA2. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может быть выделен или очищен.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 может содержать полипептид, который имеет, по меньшей мере, 65% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ее каталитически активной частью. Например, вариант белка ADA2 может содержать полипептид, который имеет, по меньшей мере, 70%, 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% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ее каталитически активной частью. Например, вариант белка ADA2 содержит полипептид, который имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13-63 или 71-285, или ее каталитически активную часть. В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активная часть содержат последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 551-579 или 581-993, или ее каталитически активную часть.

В некоторых вариантах воплощения, вариант белка ADA2 или его каталитически активной части может содержать аминокислотные замены, выбранные из замен, соответствующих K11A/R20A; K11A/R20A/K371A; R20A/K371A; K11A/K371A; S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E;

S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; R219Q/S262N; R219Q/S262N/K11A; R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E; R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A; R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A; R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A; R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N; R219Q/S262N/H264G; R219K/S262N; R219N/S262N; R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V; R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D; R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T; R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G; R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M; R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A; R219Q/S262N/R20A/K371A; R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D; R219Q/S262N/K26E; R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A; R219Q/S262N/K258D; R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E; R219Q/S262N/R283A; R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A; R219Q/S262N/K309D; R219Q/S262N/K309E; R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A; R219Q/S262N/K321D; R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E; R219Q/S262N/R441A; R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D; R219Q/S262N/K444E; R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A; R219Q/S262N/K469D; R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E; R219Q/S262N/D86A; R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F;

R219Q/S262N/D86G; R219Q/S262N/D86H; R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K; R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M; R219Q/S262N/D86N; R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R; R219Q/S262N/D86S; R219Q/S262N/D86T; R219Q/S262N/D86V; R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C; R219Q/S262N/E179F; R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I; R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L; R219Q/S262N/E179M; R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q; R219Q/S262N/E179R; R219Q/S262N/E179W; R219Q/S262N/E179Y; R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N; R219G/S262N; R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N; R219S/S262N; R219T/S262N; R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N; R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D; R219Q/S262N/L221E; R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I; R219Q/S262N/L221K; R219Q/S262N/L221M; R219Q/S262N/L221N; R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R; R219Q/S262N/L221S; R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W; R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C; R219Q/S262D; R219Q/S262E; R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262K; R219Q/S262L; R219Q/S262P; R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T; R219Q/S262W; R219Q/S262Y; R219Q/S262N/H264C; R219Q/S262N/H264D; R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F; R219Q/S262N/H264I; R219Q/S262N/H264K; R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M; R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R; R219Q/S262N/H264S; R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W; R219Q/S262N/H264Y; R219Q/S262N/S266A; R219Q/S262N/S266C; R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F; R219Q/S262N/S266G; R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I; R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L; R219Q/S262N/S266M; R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q; R219Q/S262N/S266R; R219Q/S262N/S266T; R219Q/S262N/S266V; R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y;

R219Q/S262N/K267A; R219Q/S262N/K267C; R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E; R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G; R219Q/S262N/K267H; R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N; R219Q/S262N/K267P; R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T; R219Q/S262N/K267V; R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C; R219Q/S262N/V296D; R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H; R219Q/S262N/V296I; R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N; R219Q/S262N/V296P; R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T; R219Q/S262N/V296W; R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A; S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; и S262N/K11A/K371A, со ссылкой на SEQ ID NO: 5.

Вариант белка ADA2 может представлять собой мономер или димер. В частности, варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе, включают димеры варианта белка ADA2, которые могут включать любые предусмотренные варианты белка ADA2. В некоторых примерах, димер может представлять собой гомодимер. В других примерах, димер может представлять собой гетеродимер.

Предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе. Также в настоящем документе предусмотрен вектор, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую любые варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе. Вектор может представлять собой эукариотический или прокариотический вектор, такой как вектор млекопитающих или вирусный вектор. Например, вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе адено-ассоциированного вируса, ретровирусный вектор, вектор на основе вируса герпеса, лентивирусный вектор, вектор на основе поксвируса или вектор на основе цитомегаловируса. В некоторых вариантах воплощения, вектор

представляет собой онколитический вектор. В некоторых вариантах воплощения, вектор также может кодировать растворимую гиалуронидазу. Также в настоящем документе предусмотрены клетки, содержащие любые векторы, предусмотренные в настоящем документе. Клетка может представлять собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающих. Если клетки человеческие, они выделены или предусмотрены в виде культуры клеток. Например, клетка представляет собой клетку млекопитающих, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO). В некоторых вариантах воплощения, клетка может экспрессировать вариант белка ADA2, например, димер. Также в настоящем документе предусмотрены варианты белка ADA2, такие как варианты димеров ADA2, которые продуцируются клеткой, предусмотренной в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения, клетка представляет собой выделенную клетку или культуру клеток, например, эукариотическая клетка, не человеческая клетка, клетка млекопитающих или клетка, которая не является человеческой стволовой клеткой. В некоторых вариантах воплощения, клетка представляет собой иммунную клетку, такую как Т-клетка, инфильтрующий опухоль лимфоцит (TIL), цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), естественный киллер (NK) или лимфокин-активированная клетка-киллер (LAK). В некоторых вариантах воплощения, клетка представляет собой Т-клетку, которая кодирует и экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) и вариант белка или димера ADA2. В некоторых примерах, CAR специфичен к антигену опухолевой клетки, и опухолевой антиген выбран из HER2, CD19, HERV-K, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипида F77, EGFRvIII, GD-2, NY- ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и GD2 и их комбинаций.

В настоящем документе предусмотрены конъюгаты, которые включают вариант белка ADA2 или каталитически активной части любого белка ADA2, предусмотренного в настоящем документе, например, димерный вариант ADA2, предусмотренный в любых примерах в настоящем документе, соединенный напрямую или не напрямую через линкер с гетерологичным фрагментом, таким как токсин или терапевтическое лекарственное средство.

Также в настоящем документе предусмотрены конъюгаты, которые включают белок ADA2, соединенный напрямую или не напрямую через линкер с гетерологичным фрагментом. В любых конъюгатах белок ADA2 может представлять собой мономер или димер. В некоторых примерах, димер представляет собой гомодимер; в других примерах, димер представляет собой гетеродимер. В любых конъюгатах в примерах в настоящем документе гетерологичный фрагмент конъюгирован с одной или несколькими субъединицами в димере. Гетерологичный фрагмент, например, может быть выбран из пептида, низкомолекулярного соединения, нуклеиновой кислоты, углевода или полимера.

В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, гетерологичный фрагмент представляет собой удлиняющий время полужизни фрагмент. Например, удлиняющий время полужизни фрагмент выбран из биосовместимых жирных кислот и их производных, гидроксиалкилкрахмала (HAS), полиэтиленгликоля (PEG), поли $(Gly_x- Ser_y)_n$, гомоаминокислотных полимеров (HAP), гиалуроновой кислоты (HA), полимеров гепарозана (HEP), полимеров на основе фосфорилхолина (PC полимер), флексимеров, декстрана, полисиаловых кислот (PSA), Fc домена, трансферрина, альбумина, эластиноподобных пептидов, последовательностей XTEN, альбумин-связывающих пептидов, пептида CTP и любой их комбинации.

В некоторых примерах, удлиняющий время полужизни фрагмент представляет собой PEG, и белок ADA2 является пегилированным. Например, PEG может быть выбран из метоксиполиэтиленгликолей (mPEG), PEG-глицидиловых эфиров (Epox-PEG), PEG-оксикарбонилимидазола (CDI-PEG), разветвленных PEG и полиэтиленоксида (PEO). В некоторых примерах, PEG имеет молекулярную массу от или примерно от 1 кДа до примерно 100 кДа. PEG может быть линейным или разветвленным. В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, PEG фрагменты получают реакцией с PEG реагентом, выбранным из mPEG-сукцинимидил пропионатов (mPEG-SPA), mPEG сукцинимидил карбоксиметилового эфира (mPEG-SCM), mPEG-сукцинимидил бутаноатов (mPEG-SBA), mPEG2-N-гидроксилсукцинимида, mPEG-сукцинимидил бутаноата (mPEG-SBA), mPEG-

сукцинимидил α-метилбутаноата (mPEG-SMB), mPEG-бутиральдегида, PEG-п-нитрофенил-карбоната и PEG-пропиональдегида. Например, PEG фрагменты получают реакцией с PEG реагентом, выбранным из mPEG-SCM (20 кДа), mPEG-SCM (30 кДа), mPEG-SBA (5kDa), mPEG-SBA (20 кДа), mPEG-SBA (30 кДа), mPEG-SMB (20 кДа), mPEG-SMB (30 кДа), mPEG-бутиральдегида (30 кДа), mPEG-SPA (20 кДа), mPEG-SPA (30 кДа), mPEG2-NHS (10 кДа разветвленный), mPEG2-NHS (20 кДа разветвленный), mPEG2-NHS (40 кДа разветвленный), mPEG2-NHS (60 кДа разветвленный), PEG-NHS-биотина (5 кДа биотинилированный), PEG-п-нитрофенил-карбоанта (30 кДа) и PEG-пропиональдегида (30 кДа).

В вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активную форму. Например, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активной частью. Например, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активной частью. В другом примере, белок ADA2 может включать полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или его каталитически активную часть.

В вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 представляет собой вариант белка ADA2, который содержит последовательность аминокислот, которая включает модификацию (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного белка

ADA2, или его каталитически активную часть, где немодифицированный белок ADA2 содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или может представлять собой его каталитически активную часть. В любых таких примерах, аминокислотная модификация (аминокислотные модификации) выбрана из аминокислотной замены (аминокислотных замен), делеции (делеций) и вставки (вставок); и вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин. В любых конъюгатах, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^3 M^{-1} c^{-1}, 6×10^3 M^{-1} c^{-1}, 7×10^3 M^{-1} c^{-1}, 8×10^3 M^{-1} c^{-1}, 9×10^3 M^{-1} c^{-1}, 1×10^4 M^{-1} c^{-1}, 2×10^4 M^{-1} c^{-1}, 3×10^4 M^{-1} c^{-1}, 4×10^4 M^{-1} c^{-1}, 5×10^4 M^{-1} c^{-1}, 6×10^4 M^{-1} c^{-1}, 7×10^4 M^{-1} c^{-1}, 8×10^4 M^{-1} c^{-1}, 9×10^4 M^{-1} c^{-1}, 1×10^5 M^{-1} c^{-1}, 2×10^5 M^{-1} c^{-1}, 3×10^5 M^{-1} c^{-1}, 4×10^5 M^{-1} c^{-1}, 5×10^5 M^{-1} c^{-1} или больше.

В любых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, модификация (модификации) белка ADA2 может представлять собой аминокислотную замену (аминокислотные замены); и вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, в некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S,

E179T, E179V, E179W, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D, K470E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D и K452E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых примерах, вариант белка ADA2 может включать аминокислотные замены, выбранные из K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E,

R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E и R219Q/S262N, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать модификацию одной или нескольких аминокислот в предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB), которая представляет собой аминокислотную делецию, вставку или замену. Например, в некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать делецию одного или нескольких смежных аминокислотных остатков, соответствующих любому одному или нескольким смежным аминокислотным остаткам между или примерно между аминокислотными остатками 98 и 156 или аминокислотными остатками 105 и 148, включительно, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых примерах, вариант белка ADA2 в конъюгате может также включать замену удаленной области на пептидный линкер. Например, пептидный линкер может быть выбран из (Gly)n (SEQ ID NO:368), где n представляет собой число от 2 до 20; (GGGGS)n (SEQ ID NO:343), где n представляет собой число от 1 до 6; (SSSSG)n (SEQ ID NO:344), где n представляет собой число от 1 до 6; (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), где n представляет собой число от 1 до 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); и EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349). В некоторых примерах, пептидный линкер может быть выбран из GGG (SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); и GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372). Например, модификация в PRB домене может соответствовать C105-T147del→$(Gly)_n$, где n представляет собой число от 2 до 20, например, C105-T147del→$(Gly)_{15}$, C105-T148del→$(Gly)_{10}$, C105-T147del→$(Gly)_7$, C105-T147del→$(Gly)_5$ или C105-T147del→$(Gly)_3$, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 в конъюгате может быть гликозилированным по одному или нескольким нативным или не нативным сайтам

гликозилирования. Например, в некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, содержащих вариант белка ADA2, вариант белка ADA2 в конъюгате может включать модификацию (модификации), которые изменяют гликозилирования за счет введения не нативного сайта гликозилирования. Не нативный сайт гликозилирования может быть введен путем создания канонической последовательности гликозилирования (NXT/S, где X не является Pro для N-связанных углеводов, S/T для O-связаннных) за счет введения аминокислотной замены (аминокислотных замен), вставок или делеций одной, двух или трех аминокислот. Например, модификации, которые изменяют гликозилирование, выбраны из модификаций, соответствующих ---→N1/---→A2/---→S3, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S и G404N/P406S, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 в конъюгате может иметь последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13-63 или 71-285, или ее каталитически активную часть.

В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, содержащих ADA2 или вариант белка ADA2, предусмотренный в настоящем документе, конъюгат сохраняет активность аденозиндезаминазы по сравнению с белком ADA2, не являющимся конъюгированным. Например, конъюгат может обнаруживать от или примерно от 50% до 500%, от 50% до 200%, от 50% до 100%, от 50% до 80%, от 80% до 500%, от 80% до 200%, от 80% до 100%, от 100% до 500% или от 100% до 200%, включительно, активности аденозиндезаминазы белка ADA2, не являющегося конъюгированным, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше активности аденозиндезаминазы белка ADA2, не являющегося конъюгированным. В некоторых вариантах воплощения конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, ADA2 в конъюгате может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 6 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 7 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 8 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 9 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 1 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 2 x 10^4 M^{-1}

c^{-1}, 3 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 6 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 7 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 8 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 9 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 1 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 2 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 3 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^5 M^{-1} c^{-1} или больше.

Предусмотрены комбинации, содержащие любой вариант белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренный в настоящем документе, любой димер варианта ADA2, предусмотренный в настоящем документе, или любой конъюгат из любых примеров, предусмотренных в настоящем документе, и терапевтический агент. Также в настоящем документе предусмотрены комбинации, содержащие любой белок ADA2 и терапевтический агент. В любых примерах комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может представлять собой мономер или димер. Например, белок ADA2 может представлять собой димер, такой как гомодимер.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, терапевтический агент может быть выбран из антитела, цитотоксического агента, химиотерапевтических агентов, цитокина, агентов, ингибирующих рост, антигормонального агента, ингибитора киназ, антиангиогенного агента, кардиозащитного агента, иммуностимулирующего агента, иммуносупрессирующего агента, ингибитора иммунных контрольных точек, антибиотика и ингибитора ангиогенеза. Например, терапевтический агент может представлять собой противораковый агент. В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, противораковый агент может представлять собой противораковое антитело, химиотерапевтический агент, радиоиммунотерапевтический агент, антиангиогенный агент или ингибитор иммунных контрольных точек.

Например, противораковый агент может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек; и мишень ингибитора иммунных контрольных точек может быть выбрана из CTLA4, PD-1 и PD-L1.В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, ингибитор иммунных контрольных точек может представлять собой антитело, белок слияния, аптамер или их фрагмент, связывающий белок иммунных контрольных точек. Например, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело против белка иммунных контрольных точек или его

антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных примерах, ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела против CTLA4, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента; антитела против PD-L1, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента; и антитела против PD-1, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, ингибитор иммунных контрольных точек может быть выбран из ипилимумаба, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента; тремелимумаба, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента; ниволумаба, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента; и пидилизумаба, его производного или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, терапевтический агент может представлять собой антигиалуронановый агент. Например, антигиалуронановый агент может представлять собой растворимую гиалуронидазу. В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, растворимая гиалуронидаза может обладать гиалуронидазной активностью при нейтральном pH. В частности, растворимая гиалуронидаза может быть выбрана из бычьей, овечьей или укороченной с С-конца человеческой PH20, у которой отсутствует вся последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря или ее часть. Например, растворимая гиалуронидаза представляет собой укороченную с С-конца человеческую PH20, у которой отсутствует вся последовательность присоединения GPI якоря или ее часть, например, приведенную в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, или которая имеет последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, и является растворимой и сохраняет гиалуронидазную активность. В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, антигиалуронановый агент или растворимая гиалуронидаза может быть конъюгирована с полимером, таким как PEG фрагмент.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может включать полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или его каталитически активную форму. Например, белок ADA2 может включать белок, имеющий последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или его каталитически активную часть. В конкретных примерах, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5. Например, белок ADA2 может включать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 представляет собой вариант белка ADA2, имеющий последовательность аминокислот, которая включает модификацию (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного полипептида ADA2 или его каталитически активной части. В любых таких примерах, немодифицированный белок ADA2 может включать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или последовательность аминокислот которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или может представлять собой его каталитически активную часть; аминокислотная модификация (аминокислотные модификации) выбрана из аминокислотной замены (аминокислотных замен), делеции (делеций) и вставки (вставок); и вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую активность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 6 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 7 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 8 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 9 x 10^3 M^{-1} c^{-1}, 1 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 2 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 3 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 6 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 7 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 8 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 9 x 10^4 M^{-1} c^{-1}, 1 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 2 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 3 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 4 x 10^5 M^{-1} c^{-1}, 5 x 10^5 M^{-1} c^{-1} или больше.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, модификация (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного белка ADA2 может включать аминокислотную замену (аминокислотные замены); и вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I,

S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D и K470E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В конкретных примерах, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D и K452E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых примерах комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать аминокислотные замены, выбранные из K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E и R219Q/S262N, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать модификацию одной или нескольких аминокислот в предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB), где модификация представляет собой аминокислотную делецию, вставку или замену. Например, вариант ADA2 может включать делецию одного или нескольких смежных аминокислотных остатков, соответствующих любому одному или нескольким смежным аминокислотным

остаткам между или примерно между аминокислотными остатками 98 и 156 или аминокислотными остатками 105 и 148, включительно, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах воплощения, вариант полипептида ADA2 может также включать замену удаленной области на пептидный линкер. Например, пептидный линкер может быть выбран из (Gly)n (SEQ ID NO:368), где n представляет собой число от 2 до 20; (GGGGS)n (SEQ ID NO:343), где n представляет собой число от 1 до 6; (SSSSG)n (SEQ ID NO:344), где n представляет собой число от 1 до 6; (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), где n представляет собой число от 1 до 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); и EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349). В конкретных примерах, пептидный линкер выбран из GGG (SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); и GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372). В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, модификация в PRB домене варианта полипептида ADA2 соответствует C105-T147del→$(Gly)_n$, где n представляет собой число от 2 до 20, например, C105-T147del→$(Gly)_{15}$, C105-T147del→$(Gly)_{10}$, C105-T147del→$(Gly)_7$, C105-T147del→$(Gly)_5$ или C105-T147del→$(Gly)_3$, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 в комбинации может быть гликозилирован по одному или нескольким нативным или не нативным сайтам гликозилирования. Например, в некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, содержащих вариант белка ADA2, вариант белка ADA2 в комбинации включает модификацию (модификации), которые изменяют гликозилирование за счет введения не нативных сайтов гликозилирования. Не нативный сайт гликозилирования вводится путем аминокислотной замены (аминокислотных замен) или вставки одной, двух или трех аминокислот. Например, модификации, которые изменяют гипергликозилирование, могут быть выбраны из модификаций,

соответствующих ---→N1/---→A2/---→S3, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S и G404N/P406S, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, вариант полипептида ADA2 имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13-63 или 71-285, или его каталитически активной части.

В настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, которые могут включать любой вариант белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренный в настоящем документе, любой димер варианта ADA2, предусмотренный в настоящем документе, или любой конъюгат, предусмотренный в настоящем документе, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах воплощения, фармацевтическая композиция может быть получена для локального или системного введения. Например, фармацевтическая композиция получена для внутривенного введения.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения опухоли или рака у субъекта, которые могут включать введение субъекту любого варианта белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренных в настоящем документе, любого димера варианта ADA2, предусмотренного в настоящем документе, любого конъюгата, предусмотренного в настоящем документе, или любой комбинации, предусмотренной в настоящем документе. Также предусмотрены медицинские применения или фармацевтические композиции для применения любых вариантов белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренных в настоящем документе, любого димера варианта ADA2, предусмотренного в настоящем документе, или любого конъюгата, предусмотренного в настоящем документе, для лечения опухоли или рака у субъекта. Также предусмотрены комбинации для применения любых комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, для применения в лечении опухоли или рака.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения опухоли или рака у субъекта, которые могут включать введение субъекту любого белка

ADA2. Также предусмотрены медицинские применения белка ADA2 или фармацевтической композиции для применения, содержащей белок ADA2, для лечения опухоли или рака. Также предусмотрены комбинации для применения, содержащие белок ADA2 и терапевтический агент для лечения опухоли или рака.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или применений, предусмотренных в настоящем документе, опухоль может представлять собой солидную опухоль или метастатическую опухоль. В конкретных примерах, опухоль может представлять собой карциному, глиому, саркому, аденокарциному, аденосаркому или аденому. В некоторых вариантах воплощения, опухоль может представлять собой опухоль груди, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, яичника, предстательной железы, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки или печени.

В некоторых вариантах воплощения способов, предусмотренных в настоящем документе, субъект может быть выбран для лечения на основании повышенных уровней аденозина плазмы, опухоль-ассоциированной экспрессии аденозинового рецептора (ADR) или опухоль-ассоциированной экспрессии нуклеотидазы. В конкретных примерах, ADR представляет собой A2A или A2B. В конкретных примерах, нуклеотидаза представляет собой CD39 или CD73. В некоторых вариантах воплощения способов, предусмотренных в настоящем документе, повышенный уровень превышает, по меньшей мере, в 0,5 раз, 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз или больше заранее установленный уровень или заранее установленное количество или уровень в контрольном образце.

В некоторых вариантах воплощения способов, предусмотренных в настоящем документе, способ лечения опухоли или рака у субъекта может также включать введение одного или нескольких противораковых агентов или вариантов лечения. Например, противораковый агент может быть выбран из противоракового антитела, химиотерапевтического агента,

радиоиммунотерапевтического агента, антиангиогенного агента и ингибитора иммунных контрольных точек.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, которые могут включать введение субъекту любого варианта белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренного в настоящем документе, любого димера варианта ADA2, предусмотренного в настоящем документе, любого конъюгата, предусмотренного в настоящем документе, или любой комбинации, предусмотренной в настоящем документе, для лечения заболевания или состояния, являющихся нераковым гиперпролиферативным заболеванием, фиброзным заболеванием, инфекционным заболеванием, васкулопатией или тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Также предусмотрены медицинские применения или фармацевтические композиции для применения любого из вариантов белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренных в настоящем документе, любого димера варианта ADA2, предусмотренного в настоящем документе, или любого конъюгата, предусмотренного в настоящем документе, для лечения неракового гиперпролиферативного заболевания, фиброзного заболевания, инфекционного заболевания, васкулопатии или тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) у субъекта. Также предусмотрены комбинации для применения любой из комбинаций, предусмотренных в настоящем документе, для применения в лечении неракового гиперпролиферативного заболевания, фиброзного заболевания, инфекционного заболевания, васкулопатии или тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID). Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения заболевания или состояния у субъекта, которые могут включать введение субъекту любого белка ADA2 для лечения заболевания или состояния, которое представляет собой нераковое гиперпролиферативное заболевание, фиброзное заболевание, инфекционное заболевание, васкулопатию или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID). Также предусмотрены медицинские применения белка ADA2 или фармацевтических композиций для применения, содержащих белок ADA2, в лечении заболевания или состояния, являющихся нераковым гиперпролиферативным заболеванием, фиброзным заболеванием,

инфекционным заболеванием, васкулопатией или тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Также предусмотрены комбинации для применения, содержащие белок ADA2 и терапевтический агент для лечения заболевания или состояния, являющихся нераковым гиперпролиферативным заболеванием, фиброзным заболеванием, инфекционным заболеванием, васкулопатией или тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID)

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или применений, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может представлять собой мономер или димер. Например, белок ADA2 может представлять собой димер, в частности, гомодимер. В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может содержать последовательности аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активную форму. Например, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или еекаталитически активной части. В конкретных примерах, белок ADA2 может содержать последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активную часть. Например, белок ADA2 может содержать последовательности аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2

представляет собой вариант белка ADA2, который включает модификацию (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного полипептида ADA2 или его каталитически активной части. В любых таких примерах, немодифицированный белок ADA2 может включать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 5, или может представлять собой его каталитически активную часть; аминокислотная модификация (аминокислотные модификации) выбрана из аминокислотной замены (аминокислотных замен), делеции (делеций) и вставки (вставок); и вариант белка ADA2, когда находится в форме димера, может обладать активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2, когда находится в форме димера, может демонстрировать каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M), равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^3 M^{-1} c^{-1}, 6×10^3 M^{-1} c^{-1}, 7×10^3 M^{-1} c^{-1}, 8×10^3 M^{-1} c^{-1}, 9×10^3 M^{-1} c^{-1}, 1×10^4 M^{-1} c^{-1}, 2×10^4 M^{-1} c^{-1}, 3×10^4 M^{-1} c^{-1}, 4×10^4 M^{-1} c^{-1}, 5×10^4 M^{-1} c^{-1}, 6×10^4 M^{-1} c^{-1}, 7×10^4 M^{-1} c^{-1}, 8×10^4 M^{-1} c^{-1}, 9×10^4 M^{-1} c^{-1}, 1×10^5 M^{-1} c^{-1}, 2×10^5 M^{-1} c^{-1}, 3×10^5 M^{-1} c^{-1}, 4×10^5 M^{-1} c^{-1}, 5×10^5 M^{-1} c^{-1} или больше.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, модификация (модификации) в последовательности аминокислот немодифицированного полипептида ADA2 может включать аминокислотную замену (аминокислотные замены); и вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотных положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 11, 13, 20, 22, 26, 86, 179, 217, 219, 221, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, со ссылкой на аминокислотные положения,

приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H654S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E, K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D и K470E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В конкретных примерах, вариант белка ADA2 может включать одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452D и K452E, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В

некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать аминокислотные замены, выбранные из K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, S262N/R20E, S262N/R20E/K371D, S262N/R20E/K371E, R219Q/K371E, R219Q/K371D, R219Q/R20E, R219Q/K371E/R20E, R219Q/K371D/R20E, R219Q/S262N/K371E, R219Q/S262N/K371D, R219Q/S262N/R20E, R219Q/S262N/K371E/R20E, R219Q/S262N/K371D/R20E и R219Q/S262N, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может включать модификацию одной или нескольких аминокислот в предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB), такую как аминокислотная делеция, вставка или замена. Например, вариант ADA2 может включать делецию одного или нескольких смежных аминокислотных остатков, соответствующих любому одному или нескольким смежным аминокислотным остаткам между или примерно между аминокислотными остатками 98 и 156 или аминокислотными остатками 105 и 148, включительно, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. В любом из таких примеров способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 может также включать замену удаленной области на пептидный линкер. Например, пептидный линкер выбран из (Gly)n (SEQ ID NO:368), где n представляет собой число от 2 до 20; (GGGGS)n (SEQ ID NO:343), где n представляет собой число от 1 до 6; (SSSSG)n (SEQ ID NO:344), где n представляет собой число от 1 до 6; (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), где n представляет собой число от 1 до 6; GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); и EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349). В конкретных примерах пептидный линкер выбран из GGG

(SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); и GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372).

Например, модификация в PRB домене белка ADA2 соответствует C105-T147del→$(Gly)_n$, где n представляет собой число от 2 до 20, например, C105-T147del→$(Gly)_{15}$, C105-T147del→$(Gly)_{10}$, C105-T147del→$(Gly)_7$, C105-T147del→$(Gly)_5$ или C105-T147del→$(Gly)_3$, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, белок ADA2 может быть гликозилирован по одному или нескольким нативным или не нативным сайтам гликозилирования. Например, в некоторых вариантах воплощения, предусмотренных в настоящем документе, содержащих вариант белка ADA2, вариант белка ADA2 включает модификацию (модификации), которые изменяют гликозилирование за счет введения не нативного сайта гликозилирования. Например, не нативный сайт гликозилирования вводится путем аминокислотной замены (аминокислотных замен) или вставки одной, двух или трех аминокислот. В конкретных примерах, модификации, которые изменяют гликозилирование, выбраны из модификаций, соответствующих --→N1/--→A2/--→S3, R20N/V22S, K371N/D373S, K372N/I374S, T403N/H405S и G404N/P406S, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или комбинаций для применения, предусмотренных в настоящем документе, вариант ADA2 может включать полипептид, который имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13-63 или 71-285, или его каталитически активную часть.

В некоторых вариантах воплощения способов, применений, фармацевтических композиций для применения или применений, предусмотренных в настоящем документе, субъектом может являться млекопитающее, в частности, человек. В некоторых вариантах воплощения

способов, предусмотренных в настоящем документе, фармацевтическая композиция может вводиться парентерально, локально или системно. Например, фармацевтическая композиция может вводиться интраназально, внутримышечно, внутрикожно, внутрибрюшинно, внутривенно, подкожно, перорально или путем легочного введения.

В некоторых вариантах воплощения, в варианте белка ADA2 или его каталитически активной части, предусмотренных в настоящем документе, вариант белка ADA2 в способах, композициях, конъюгатах, модифицированных формах, векторах, клетках, комбинациях, применениях или композициях для применения, и нуклеиновые кислоты, кодирующие вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, и векторы, которые включают нуклеиновые кислоты, модификации могут представлять собой любую модификацию или любые модификации из приведенных ниже аминокислотных замен, вставок, делеций, и любую их комбинацию. Модификации, перечисленные ниже, даны со ссылкой на нумерацию в зрелом белке, как нумерация аминокислотных положений, приведенная в SEQ ID NO: 5.

Примерами вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, являются нижеследующие; понятно, что разные типы мутантов (аминокислотные модификации) могут сочетаться друг с другом, чтобы использовать свойства каждого типа мутаций. Специалистам в данной области техники понятно, что в целом эффекты мутаций в белках являются, по меньшей мере, аддитивными и могут быть синергичными.

1. Гепарин связывающие мутанты

Следующие модификации могут приводить к снижению связывания с гепарином. Связывание с гепарином может вызывать истощение циркулирующих уровней введенной ADA2. Следовательно, нижеследующие варианты ADA2 могут увеличивать биодоступность и улучшать фармакокинетику введенной ADA2:

K11A; K11D; K11E; K13A; K13D; K13E; K371A; K371D; K371E; K372A; K372D; K372E; K452A; K452D; K452E; R20A; R20D; R20E; R366A; R366D; R366E; K26A; K26D; K26E; R217A; R217D; R217E; K258A; K258D; K258E; R277A; R277D; R277E; R283A; R283D; R283E; K309A; K309D; K309E; K317A;

K317D; K317E; K321A; K321D; K321E; R352A; R352D; R352E; R441A; R441D; R441E; K444A; K444D; K444E; K461A; K461D; K461E; K469A; K469D; K469E; K470A; K470D; и K470E.

Примеры гепарин связывающих мутантов, содержащих эти замены.

K11A (SEQ ID NO: 13); K11D (SEQ ID NO: 14); K11E (SEQ ID NO: 15); K13A (SEQ ID NO: 16); K13D (SEQ ID NO: 17); K13E (SEQ ID NO: 18); K371A (SEQ ID NO: 19); K371D (SEQ ID NO:20); K371E (SEQ ID NO:21); K372A (SEQ ID NO:22); K372D (SEQ ID NO:23); K372E (SEQ ID NO:24); K452A (SEQ ID NO:25); K452D (SEQ ID NO:26); K452E (SEQ ID NO:27); R20A (SEQ ID NO:28); R20D (SEQ ID NO:29); R20E (SEQ ID NO:30); R366A (SEQ ID NO:31); R366D (SEQ ID NO:32); R366E (SEQ ID NO:33); K26A (SEQ ID NO:71); K26D (SEQ ID NO:72); K26E (SEQ ID NO:73); R217A (SEQ ID NO:74); R217D (SEQ ID NO:75); R217E (SEQ ID NO:76); K258A (SEQ ID NO:77); K258D (SEQ ID NO:78); K258E (SEQ ID NO:79); R277A (SEQ ID NO:80); R277D (SEQ ID NO:81); R277E (SEQ ID NO:82); R283A (SEQ ID NO:83); R283D (SEQ ID NO:84); R283E (SEQ ID NO:85); K309A (SEQ ID NO:86); K309D (SEQ ID NO:87); K309E (SEQ ID NO:88); K317A (SEQ ID NO:89); K317D (SEQ ID NO:90); K317E (SEQ ID NO:91); K321A (SEQ ID NO:92); K321D (SEQ ID NO:93); K321E (SEQ ID NO:94); R352A (SEQ ID NO:95); R352D (SEQ ID NO:96); R352E (SEQ ID NO:97); R441A (SEQ ID NO:98); R441D (SEQ ID NO:99); R441E (SEQ ID NO: 100); K444A (SEQ ID NO: 101); K444D (SEQ ID NO: 102); K444E (SEQ ID NO: 103); K461A (SEQ ID NO: 104); K461D (SEQ ID NO: 105); K461E (SEQ ID NO: 106); K469A (SEQ ID NO: 107); K469D (SEQ ID NO: 108); K469E (SEQ ID NO: 109); K470A (SEQ ID NO: 110); K470D (SEQ ID NO: 111); и K470E (SEQ ID NO: 112).

2. Мутанты с мутациями в активном сайте

Следующие модификации могут приводить к увеличению каталитической активности. Модификации осуществлены в выбранных остатках активного сайта, и могут влиять на увеличение каталитической активности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина. Связывание с гепарином может приводить к истощению циркулирующих уровней введенной ADA2. Следовательно,

следующие варианты ADA2 могут приводить к увеличению активности аденозиндезаминазы:

H264A; H264Q; H264N; H264G; R219K; R219Q; R219N; R219A; L221A; L221V; L221G; E179D; E179A; E179S; E179T; E179V; E179G; S262A; S262V; S262M; S262N; D86A; D86C; D86E; D86F; D86G; D86H; D86I; D86K; D86L; D86M; D86N; D86P; D86Q; D86R; D86S; D86T; D86V; D86W; D86Y; E179C; E179F; E179H; E179I; E179K; E179L; E179M; E179N; E179P; E179Q; E179R; E179W; E179Y; R219C; R219D; R219E; R219F; R219G; R219H; R219I; R219L; R219M; R219P; R219S; R219T; R219V; R219W; R219Y; L221C; L221D; L221E; L221F; L221H; L221I; L221K; L221M; L221N; L221P; L221Q; L221R; L221S; L221T; L221W; L221Y; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262K; S262L; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262W; S262Y; H264C; H264D; H264E; H264F; H264I; H264K; H264L; H264M; H264P; H264R; H264S; H264T; H264V; H264W; H264Y; S266A; S266C; S266D; S266E; S266F; S266G; S266H; S266I; S266K; S266L; S266M; S266N; S266P; S266Q; S266R; S266T; S266V; S266W; S266Y; K267A; K267C; K267D; K267E; K267F; K267G; K267H; K267I; K267L; K267M; K267N; K267P; K267Q; K267R; K267S; K267T; K267V; K267W; K267Y; V296A; V296C; V296D; V296E; V296F; V296G; V296H; V296I; V296K; V296L; V296M; V296N; V296P; V296Q; V296R; V296S; V296T; V296W; и V296Y.

Примеры мутантов с мутациями в активном сайте, содержащие эти замены:

H264A (SEQ ID NO:34); H264Q (SEQ ID NO:35); H264N (SEQ ID NO:36); H264G (SEQ ID NO:37); R219K (SEQ ID NO:38); R219Q (SEQ ID NO:39); R219N (SEQ ID NO:40); R219A (SEQ ID NO:41); L221A (SEQ ID NO:42); L221V (SEQ ID NO:43); L221G (SEQ ID NO:44); E179D (SEQ ID NO:45); E179A (SEQ ID NO:46); E179S (SEQ ID NO:47); E179T (SEQ ID NO:48); E179V (SEQ ID NO:49); E179G (SEQ ID NO: 50); S262A (SEQ ID NO: 51); S262V (SEQ ID NO: 52); S262M (SEQ ID NO: 53); S262N (SEQ ID NO: 54); D86A (SEQ ID NO: 113); D86C (SEQ ID NO: 114); D86E (SEQ ID NO: 115); D86F (SEQ ID NO: 116); D86G (SEQ ID NO: 117); D86H (SEQ ID NO: 118); D86I (SEQ ID NO: 119); D86K (SEQ ID NO: 120); D86L (SEQ ID NO: 121); D86M (SEQ ID NO: 122); D86N (SEQ ID NO: 123);

D86P (SEQ ID NO: 124); D86Q (SEQ ID NO: 125); D86R (SEQ ID NO: 126); D86S (SEQ ID NO: 127); D86T (SEQ ID NO: 128); D86V (SEQ ID NO: 129); D86W (SEQ ID NO: 130); D86Y (SEQ ID NO: 131); E179C (SEQ ID NO: 132); E179F (SEQ ID NO: 133); E179H (SEQ ID NO: 134); E179I (SEQ ID NO: 135); E179K (SEQ ID NO: 136); E179L (SEQ ID NO: 137); E179M (SEQ ID NO: 138); E179N (SEQ ID NO: 139); E179P (SEQ ID NO: 140); E179Q (SEQ ID NO: 141); E179R (SEQ ID NO: 142); E179W (SEQ ID NO: 143); E179Y (SEQ ID NO: 144); R219C (SEQ ID NO: 145); R219D (SEQ ID NO: 146); R219E (SEQ ID NO: 147); R219F (SEQ ID NO: 148); R219G (SEQ ID NO: 149); R219H (SEQ ID NO: 150); R219I (SEQ ID NO: 151); R219L (SEQ ID NO: 152); R219M (SEQ ID NO: 153); R219P (SEQ ID NO: 154); R219S (SEQ ID NO: 155); R219T (SEQ ID NO: 156); R219V (SEQ ID NO: 157); R219W (SEQ ID NO: 158); R219Y (SEQ ID NO: 159); L221C (SEQ ID NO: 160); L221D (SEQ ID NO: 161); L221E (SEQ ID NO: 162); L221F (SEQ ID NO: 163); L221H (SEQ ID NO: 164); L221I (SEQ ID NO: 165); L221K (SEQ ID NO: 166); L221M (SEQ ID NO: 167); L221N (SEQ ID NO: 168); L221P (SEQ ID NO: 169); L221Q (SEQ ID NO: 170); L221R (SEQ ID NO: 171); L221S (SEQ ID NO: 172); L221T (SEQ ID NO: 173); L221W (SEQ ID NO: 174); L221Y (SEQ ID NO: 175); S262C (SEQ ID NO: 176); S262D (SEQ ID NO: 177); S262E (SEQ ID NO: 178); S262F (SEQ ID NO: 179); S262G (SEQ ID NO: 180); S262H (SEQ ID NO: 181); S262I (SEQ ID NO: 182); S262K (SEQ ID NO: 183); S262L (SEQ ID NO: 184); S262P (SEQ ID NO: 185); S262Q (SEQ ID NO: 186); S262R (SEQ ID NO: 187); S262T (SEQ ID NO: 188); S262W (SEQ ID NO: 189); S262Y (SEQ ID NO: 190); H264C (SEQ ID NO: 191); H264D (SEQ ID NO: 192); H264E (SEQ ID NO: 193); H264F (SEQ ID NO: 194); H264I (SEQ ID NO: 195); H264K (SEQ ID NO: 196); H264L (SEQ ID NO: 197); H264M (SEQ ID NO: 198); H264P (SEQ ID NO: 199); H264R (SEQ ID NO:200); H264S (SEQ ID NO:201); H264T (SEQ ID NO:202); H264V (SEQ ID NO:203); H264W (SEQ ID NO:204); H264Y (SEQ ID NO:205); S266A (SEQ ID NO:206); S266C (SEQ ID NO:207); S266D (SEQ ID NO:208); S266E (SEQ ID NO:209); S266F (SEQ ID NO:210); S266G (SEQ ID NO:211); S266H (SEQ ID NO:212); S266I (SEQ ID NO:213); S266K (SEQ ID NO:214); S266L (SEQ ID NO:215); S266M (SEQ ID NO:216); S266N (SEQ ID NO:217); S266P (SEQ ID NO:218); S266Q (SEQ ID NO:219); S266R (SEQ ID

NO:220); S266T (SEQ ID NO:221); S266V (SEQ ID NO:222); S266W (SEQ ID NO:223); S266Y (SEQ ID NO:224); K267A (SEQ ID NO:225); K267C (SEQ ID NO:226); K267D (SEQ ID NO:227); K267E (SEQ ID NO:228); K267F (SEQ ID NO:229); K267G (SEQ ID NO:230); K267H (SEQ ID NO:231); K267I (SEQ ID NO:232); K267L (SEQ ID NO:233); K267M (SEQ ID NO:234); K267N (SEQ ID NO:235); K267P (SEQ ID NO:236); K267Q (SEQ ID NO:237); K267R (SEQ ID NO:238); K267S (SEQ ID NO:239); K267T (SEQ ID NO:240); K267V (SEQ ID NO:241); K267W (SEQ ID NO:242); K267Y (SEQ ID NO:243); V296A (SEQ ID NO:244); V296C (SEQ ID NO:245); V296D (SEQ ID NO:246); V296E (SEQ ID NO:247); V296F (SEQ ID NO:248); V296G (SEQ ID NO:249); V296H (SEQ ID NO:250); V296I (SEQ ID NO:251); V296K (SEQ ID NO:252); V296L (SEQ ID NO:253); V296M (SEQ ID NO:254); V296N (SEQ ID NO:255); V296P (SEQ ID NO:256); V296Q (SEQ ID NO:257); V296R (SEQ ID NO:258); V296S (SEQ ID NO:259); V296T (SEQ ID NO:260); V296W (SEQ ID NO:261); и V296Y (SEQ ID NO:262).

3. Гипергликозилированные мутанты

Следующие модификации позволяют ввести не нативный сайт гликозилирования в ADA2. Введение не нативных сайтов гликозилирования, таких как N-связанные сайты гликозилирования, может привести к увеличению стабильности и улучшению фармакокинетических профилей. Следовательно, следующие варианты ADA2 могут обеспечить гипергликозилирование ADA2 и увеличение стабильности и улучшение фармакокинетических профилей введенной ADA2:

--→N1/--→A2/--→S3 ; R20N/V22S; K371N/D373S; K372N/I374S; T403N/H405S; и G404N/P406S.

Примеры гипергликозилированных мутантов, содержащих эти замены:

--→N1/--→A2/--→S3 (SEQ ID NO:274); R20N/V22S (SEQ ID NO:275); K371N/D373S (SEQ ID NO:276); K372N/I374S (SEQ ID NO:277); T403N/H405S (SEQ ID NO:278); и G404N/P406S (SEQ ID NO:279).

4. Мутанты с делецией и заменой в PRB

Следующие варианты содержат модифицированный PRB домен. Модификации PRB домена могут включать делецию всего PRB домена или части PRB домена (т.е., делецию одного или нескольких аминокислотных остатков в PRB домене), вставку одного или нескольких аминокислотных остатков в PRB домен, аминокислотную замену одного или нескольких остатков PRB домена или их комбинацию. Делеция и/или замена PRB домена может приводить к изменению активности, например, снижению связывания с рецептором и/или активности, опосредованной рецептором.

C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; C105-T147del→$(Gly)_{15}$; C105-T147del→(Gly)10; C105-T147del→$(Gly)_7$; C105-T147del→$(Gly)_5$; C105-T147del→$(Gly)_3$; N98-N156del; C105-E148del; C105-T147del; V99-Q144del; V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; C105-T147del→$(GGGGS)_1$; C105-T147del→$(GGGGS)_2$; и C105-T147del→$(GGGGS)_3$.

Примеры мутантов с делецией и заменой в PRB, содержащих эти замены:

C105-T147del→(Gly)n (SEQ ID NO:280); C105-T147del→$(Gly)_{15}$ (SEQ ID NO:281); C105-T147del→$(Gly)_{10}$ (SEQ ID NO:282); C105-T147del→$(Gly)_7$ (SEQ ID NO:283); C105-T147del→$(Gly)_5$ (SEQ ID NO:284); C105-T147del→$(Gly)_3$ (SEQ ID NO:285); N98-N156del (SEQ ID NO: 548); C105-E148del (SEQ ID NO: 549); C105-T147del (SEQ ID NO: 550); V99-Q144del (SEQ ID NO: 579); V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO: 581); C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO: 582); V99-Q144del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 583); V99-Q144del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 584); V99-Q144del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 585); C105-T147del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 586); C105-T147del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 587); и C105-T147del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 588)

5. Мутанты с гипергликозилированным PRB

За счет следующих модификаций можно ввести не нативный сайт гликозилирования в PRB домен. Введение не нативных сайтов гликозилирования, таких как N-связанные сайти гликозилирования, в PRB домен

может привести к увеличению стабильности и улучшению фармакокинетических профилей и/или других активностей, например, снижению связывания с рецептором. Следовательно, следующие варианты ADA2 могут обеспечить гипергликозилирование ADA2 в PRB домене, снизить связывание с рецептором и увеличить стабильность и улучшить фармакокинетические профили введенной ADA2:

R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; и P111N/G113S.

Примеры мутантов с гипергликозилированным PRB, содержащих эти замены:

R125N/P126A (SEQ ID NO: 552); S127N/K129S (SEQ ID NO: 553); P126N/E128T (SEQ ID NO: 554); R112N/I114T (SEQ ID NO: 555); I134N/L135C/L136T (SEQ ID NO: 556); I134N/L135S/L136T (SEQ ID NO: 557); R142N/Q144S (SEQ ID NO: 558); E137N/Y139T (SEQ ID NO: 559); и P111N/G113S (SEQ ID NO: 560).

6. Мутанты с измененным взаимодействием между доменами PRB-ADA

Следующие модификации могут привести к изменению взаимодействия между PRB доменом и оставшейся частью ADA2 (например, доменом аденозиндезаминазы (ADA)). Изменение взаимодействия между PRB доменом и оставшейся частью ADA2, такой как ADA домен, может привести к изменению активности, например, увеличению активности аденозиндезаминазы и снижению связывания с рецептором:

F119S; F119K; Y224R; Y224N; Y191S; Y191D; F183K; Y191D/Y224R; F109S; F109A; R118D; R118A; Y139T; Y139A; W133S; W133T; P124A; и P124S.

Примеры мутантов с измененным взаимодействием между доменами PRB-ADA, содержащих эти замены:

F119S (SEQ ID NO: 561); F119K (SEQ ID NO: 562); Y224R (SEQ ID NO: 563); Y224N (SEQ ID NO: 564); Y191S (SEQ ID NO: 565); Y191D (SEQ ID NO: 566); F183K (SEQ ID NO: 567); Y191D/Y224R (SEQ ID NO: 568); F109S (SEQ ID NO: 569); F109A (SEQ ID NO: 570); R118D (SEQ ID NO: 571); R118A (SEQ ID NO: 572); Y139T (SEQ ID NO: 573); Y139A (SEQ ID NO: 574); W133S (SEQ ID

NO: 575); W133T (SEQ ID NO: 576); P124A (SEQ ID NO: 577); и P124S (SEQ ID NO: 578).

7. Комбинации мутаций с гипергликозилированными мутантами

Следующие варианты сочетают модификации, которые приводят к улучшению каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина, такие как R219Q и/или S262N, и модификации, за счет которых вводят не нативные сайты гликозилирования:

R219Q/S262N/--→N1/--→A2/--→S3 ; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; и R219Q/S262N/G404N/P406S.

Комбинации с гипергликозилированными мутантами, содержащие эти замены:

R219Q/S262N/--→N1/--→A2/--→S3 (SEQ ID NO: 596); R219Q/S262N/R20N/V22S (SEQ ID NO: 597); R219Q/S262N/K371N/D373S (SEQ ID NO: 598); R219Q/S262N/K372N/I374S (SEQ ID NO: 599); R219Q/S262N/T403N/H405S (SEQ ID NO:600); и R219Q/S262N/G404N/P406S (SEQ ID NO:601).

8. Комбинации мутаций с мутантами с гипергликозилированным PRB

Следующие варианты сочетают модификации, которые приводят к улучшению каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина, такие как R219Q и/или S262N, и модификации, за счет которых вводят не нативные сайты гликозилирования в PRB домен:

R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T; R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; и R219Q/S262N/P111N/G113S.

Примеры комбинаций с мутантами с гипергликозилированным PRB, содержащие эти замены:

R219Q/S262N/R125N/P126A (SEQ ID NO:607); R219Q/S262N/S127N/K129S (SEQ ID NO:608); R219Q/S262N/P126N/E128T (SEQ ID NO:609); R219Q/S262N/R112N/I114T (SEQ ID NO:610);

R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T (SEQ ID NO:611); R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T (SEQ ID NO:612); R219Q/S262N/R142N/Q144S (SEQ ID NO:613); R219Q/S262N/E137N/Y139T (SEQ ID NO:614); и R219Q/S262N/P111N/G113S (SEQ ID NO:615).

9. Комбинации с мутантами с измененным взаимодействием между доменами PRB-ADA

Следующие варианты сочетают модификации, которые приводят к улучшению каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина, такие как R219Q и/или S262N, и модификации, которые изменяют взаимодействие между PRB доменом и оставшейся частью ADA2 (например, доменом аденозиндезаминазы (ADA)):

R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; и R219Q/S262N/P124S.

Комбинации с мутантами с измененным взаимодействием между доменами PRB-ADA, содержащие эти замены:

R219Q/S262N/F119S (SEQ ID NO:616); R219Q/S262N/F119K (SEQ ID NO:617); R219Q/S262N/Y224R (SEQ ID NO:618); R219Q/S262N/Y224N (SEQ ID NO:619); R219Q/S262N/Y191S (SEQ ID NO:620); R219Q/S262N/Y191D (SEQ ID NO:621); R219Q/S262N/F183K (SEQ ID NO:622); R219Q/S262N/Y191D/Y224R (SEQ ID NO:623); R219Q/S262N/F109S (SEQ ID NO:624); R219Q/S262N/F109A (SEQ ID NO:625); R219Q/S262N/R118D (SEQ ID NO:626); R219Q/S262N/R118A (SEQ ID NO:627); R219Q/S262N/Y139T (SEQ ID NO:628); R219Q/S262N/Y139A (SEQ ID NO:629); R219Q/S262N/W133S (SEQ ID NO:630); R219Q/S262N/W133T (SEQ ID NO:631); R219Q/S262N/P124A (SEQ ID NO:632); и R219Q/S262N/P124S (SEQ ID NO:633).

10. Комбинации с мутантами с делецией в PRB

Следующие варианты сочетают модификации, которые приводят к улучшению каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина,

такие как R219Q и/или S262N, и/или модификации, которые приводят к снижению связывания с гепарином, такие как K371D, и модификации, например, делеции, вставки, замены в PRB домене:

K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; K371D/N98-N156del; K371D/C105-E148del; K371D/C105-T147del; K371D/V99-Q144del; R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/N98-N156del; R219Q/S262N/C105-E148del; R219Q/S262N/C105-T147del; R219Q/S262N/V99-Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5;

R219Q/S262N/K371D/N98-N156del; R219Q/S262N/K371D/C105-E148del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del; R219Q/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; R219Q/N98-N156del; R219Q/C105-E148del; R219Q/C105-T147del; R219Q/V99-Q144del; S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20; S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5; S262N/N98-N156del; и S262N/C105-E148del; S262N/C105-T147del; и S262N/V99-Q144del.

Примеры комбинаций с мутантами с делецией в PRB, содержащие эти замены:

K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 589); K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 590); K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 591); K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 592); K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 593); K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 594); R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$ (SEQ ID NO:602); R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$ (SEQ ID NO:603); R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_7$ (SEQ ID NO:604); R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_5$ (SEQ ID NO:605); R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_3$ (SEQ ID NO:606); R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO:634); R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:635); R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:636); R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO:637); R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:638); R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:639); R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO:640); R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:641); R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:642); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO:643); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO:644); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:645); K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20 (SEQ ID NO:646); K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$ (SEQ ID NO:647); K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$ (SEQ ID NO:648); K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$

(SEQ ID NO:649); K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$ (SEQ ID NO:650); K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$ (SEQ ID NO:651); K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:652); K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:653); K371D/N98-N156del (SEQ ID NO:654); K371D/C105-E148del (SEQ ID NO:655); K371D/C105-T147del (SEQ ID NO:656); K371D/V99-Q144del (SEQ ID NO:657); R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20 (SEQ ID NO:658); R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:664); R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:665); R219Q/S262N/N98-N156del (SEQ ID NO:666); R219Q/S262N/C105-E148del (SEQ ID NO:667); R219Q/S262N/C105-T147del (SEQ ID NO:668); R219Q/S262N/V99-Q144del (SEQ ID NO:669); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20 (SEQ ID NO:670); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$ (SEQ ID NO:671); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$ (SEQ ID NO:672); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$ (SEQ ID NO:673); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$ (SEQ ID NO:674); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$ (SEQ ID NO:675); R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:676); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:677); R219Q/S262N/K371D/N98-N156del (SEQ ID NO:678); R219Q/S262N/K371D/C105-E148del (SEQ ID NO:679); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del (SEQ ID NO:680); R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del (SEQ ID NO:681); R219Q/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20 (SEQ ID NO:918); R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:919); R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:920); R219Q/N98-N156del (SEQ ID NO:921); R219Q/C105-E148del (SEQ ID NO:922); R219Q/C105-T147del (SEQ ID NO:923); R219Q/V99-Q144del (SEQ ID NO:924); S262N/C105-T147del→(Gly)n, где n = от 2 до 20 (SEQ ID NO:925); S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:926); S262N/C105-T147del→(GGGGS)n, где n = от 1 до 5 (SEQ ID NO:927); S262N/N98-N156del

(SEQ ID NO:928); S262N/C105-E148del (SEQ ID NO:929); S262N/C105-T147del (SEQ ID NO:930); и S262N/V99-Q144del (SEQ ID NO:931).

11. Другие комбинации мутантов

Следующие варианты сочетают различные модификации, например, модификации, которые приводят к улучшению каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина, такие как R219Q и/или S262N, модификации, которые приводят к снижению связывания с гепарином, такие как K371D, и другие модификации:

K11A/R20A; K11A/R20A/K371A; R20A/K371A; K11A/K371A; S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; R219Q/S262N; R219Q/S262N/K11A; R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E; R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A; R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A; R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A; R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N; R219Q/S262N/H264G; R219K/S262N; R219N/S262N; R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V; R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D; R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T; R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G; R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M; R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A; R219Q/S262N/R20A/K371A; R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D; R219Q/S262N/K26E; R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A; R219Q/S262N/K258D; R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E; R219Q/S262N/R283A; R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A;

R219Q/S262N/K309D; R219Q/S262N/K309E; R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A; R219Q/S262N/K321D; R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E; R219Q/S262N/R441A; R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D; R219Q/S262N/K444E; R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A; R219Q/S262N/K469D; R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E; R219Q/S262N/D86A; R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F; R219Q/S262N/D86G; R219Q/S262N/D86H; R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K; R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M; R219Q/S262N/D86N; R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R; R219Q/S262N/D86S; R219Q/S262N/D86T; R219Q/S262N/D86V; R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C; R219Q/S262N/E179F; R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I; R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L; R219Q/S262N/E179M; R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q; R219Q/S262N/E179R; R219Q/S262N/E179W; R219Q/S262N/E179Y; R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N; R219G/S262N; R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N; R219S/S262N; R219T/S262N; R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N; R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D; R219Q/S262N/L221E; R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I; R219Q/S262N/L221K; R219Q/S262N/L221M; R219Q/S262N/L221N; R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R; R219Q/S262N/L221S; R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W; R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C; R219Q/S262D; R219Q/S262E; R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262K; R219Q/S262L; R219Q/S262P; R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T; R219Q/S262W; R219Q/S262Y; R219Q/S262N/H264C; R219Q/S262N/H264D; R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F;

R219Q/S262N/H264I; R219Q/S262N/H264K; R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M; R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R; R219Q/S262N/H264S; R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W; R219Q/S262N/H264Y; R219Q/S262N/S266A; R219Q/S262N/S266C; R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F; R219Q/S262N/S266G; R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I; R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L; R219Q/S262N/S266M; R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q; R219Q/S262N/S266R; R219Q/S262N/S266T; R219Q/S262N/S266V; R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y; R219Q/S262N/K267A; R219Q/S262N/K267C; R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E; R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G; R219Q/S262N/K267H; R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N; R219Q/S262N/K267P; R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T; R219Q/S262N/K267V; R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C; R219Q/S262N/V296D; R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H; R219Q/S262N/V296I; R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N; R219Q/S262N/V296P; R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T; R219Q/S262N/V296W; R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A; S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; и S262N/K11A/K371A.

Примеры таких комбинаций мутантов, содержащих эти замены:

K11A/R20A (SEQ ID NO: 55); K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO: 56); R20A/K371A (SEQ ID NO: 57); K11A/K371A (SEQ ID NO: 58); S262N/K371D (SEQ ID NO: 59); S262N/K371E (SEQ ID NO:60); S262N/R20E (SEQ ID NO:61); S262N/R20E/K371D (SEQ ID NO:62); S262N/R20E/K371E (SEQ ID NO:63); R219Q/K371E (SEQ ID NO:263); R219Q/K371D (SEQ ID NO:264); R219Q/R20E

(SEQ ID NO:265); R219Q/K371E/R20E (SEQ ID NO:266); R219Q/K371D/R20E (SEQ ID NO:267); R219Q/S262N/K371E (SEQ ID NO:268); R219Q/S262N/K371D (SEQ ID NO:269); R219Q/S262N/R20E (SEQ ID NO:270); R219Q/S262N/K371E/R20E (SEQ ID NO:271); R219Q/S262N/K371D/R20E (SEQ ID NO:272); R219Q/S262N (SEQ ID NO:273); R219Q/S262N/K11A (SEQ ID NO:659); R219Q/S262N/K11D (SEQ ID NO:660); R219Q/S262N/K11E (SEQ ID NO:661); R219Q/S262N/K13A (SEQ ID NO:662); R219Q/S262N/K13D (SEQ ID NO:663); R219Q/S262N/K13E (SEQ ID NO:682); R219Q/S262N/K371A (SEQ ID NO:683); R219Q/S262N/K372A (SEQ ID NO:684); R219Q/S262N/K372D (SEQ ID NO:685); R219Q/S262N/K372E (SEQ ID NO:686); R219Q/S262N/K452A (SEQ ID NO:687); R219Q/S262N/K452D (SEQ ID NO:688); R219Q/S262N/K452E (SEQ ID NO:689); R219Q/S262N/R20A (SEQ ID NO:690); R219Q/S262N/R20D (SEQ ID NO:691); R219Q/S262N/R366A (SEQ ID NO:692); R219Q/S262N/R366D (SEQ ID NO:693); R219Q/S262N/R366E (SEQ ID NO:694); R219Q/S262N/H264A (SEQ ID NO:695); R219Q/S262N/H264Q (SEQ ID NO:696); R219Q/S262N/H264N (SEQ ID NO:697); R219Q/S262N/H264G (SEQ ID NO:698); R219K/S262N (SEQ ID NO:699); R219N/S262N (SEQ ID NO:700); R219A/S262N (SEQ ID NO:701); R219Q/S262N/L221A (SEQ ID NO:702); R219Q/S262N/L221V (SEQ ID NO:703); R219Q/S262N/L221G (SEQ ID NO:704); R219Q/S262N/E179D (SEQ ID NO:705); R219Q/S262N/E179A (SEQ ID NO:706); R219Q/S262N/E179S (SEQ ID NO:707); R219Q/S262N/E179T (SEQ ID NO:708); R219Q/S262N/E179V (SEQ ID NO:709); R219Q/S262N/E179G (SEQ ID NO:710); R219Q/S262A (SEQ ID NO:711); R219Q/S262V (SEQ ID NO:712); R219Q/S262M (SEQ ID NO:713); R219Q/S262N/K11A/R20A (SEQ ID NO:714); R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:715); R219Q/S262N/R20A/K371A (SEQ ID NO:716); R219Q/S262N/K11A/K371A (SEQ ID NO:717); R219Q/S262N/K26A (SEQ ID NO:718); R219Q/S262N/K26D (SEQ ID NO:719); R219Q/S262N/K26E (SEQ ID NO:720); R219Q/S262N/R217A (SEQ ID NO:721); R219Q/S262N/R217D (SEQ ID NO:722); R219Q/S262N/R217E (SEQ ID NO:723); R219Q/S262N/K258A (SEQ ID NO:724); R219Q/S262N/K258D (SEQ ID NO:725); R219Q/S262N/K258E (SEQ ID NO:726); R219Q/S262N/R277A (SEQ ID NO:727); R219Q/S262N/R277D (SEQ ID NO:728); R219Q/S262N/R277E (SEQ ID NO:729); R219Q/S262N/R283A (SEQ ID

NO:730); R219Q/S262N/R283D (SEQ ID NO:731); R219Q/S262N/R283E (SEQ ID NO:732); R219Q/S262N/K309A (SEQ ID NO:733); R219Q/S262N/K309D (SEQ ID NO:734); R219Q/S262N/K309E (SEQ ID NO:735); R219Q/S262N/K317A (SEQ ID NO:736); R219Q/S262N/K317D (SEQ ID NO:737); R219Q/S262N/K317E (SEQ ID NO:738); R219Q/S262N/K321A (SEQ ID NO:739); R219Q/S262N/K321D (SEQ ID NO:740); R219Q/S262N/K321E (SEQ ID NO:741); R219Q/S262N/R352A (SEQ ID NO:742); R219Q/S262N/R352D (SEQ ID NO:743); R219Q/S262N/R352E (SEQ ID NO:744); R219Q/S262N/R441A (SEQ ID NO:745); R219Q/S262N/R441D (SEQ ID NO:746); R219Q/S262N/R441E (SEQ ID NO:747); R219Q/S262N/K444A (SEQ ID NO:748); R219Q/S262N/K444D (SEQ ID NO:749); R219Q/S262N/K444E (SEQ ID NO:750); R219Q/S262N/K461A (SEQ ID NO:751); R219Q/S262N/K461D (SEQ ID NO:752); R219Q/S262N/K461E (SEQ ID NO:753); R219Q/S262N/K469A (SEQ ID NO:754); R219Q/S262N/K469D (SEQ ID NO:755); R219Q/S262N/K469E (SEQ ID NO:756); R219Q/S262N/K470A (SEQ ID NO:757); R219Q/S262N/K470D (SEQ ID NO:758); R219Q/S262N/K470E (SEQ ID NO:759); R219Q/S262N/D86A (SEQ ID NO:760); R219Q/S262N/D86C (SEQ ID NO:761); R219Q/S262N/D86E (SEQ ID NO:762); R219Q/S262N/D86F (SEQ ID NO:763); R219Q/S262N/D86G (SEQ ID NO:764); R219Q/S262N/D86H (SEQ ID NO:765); R219Q/S262N/D86I (SEQ ID NO:766); R219Q/S262N/D86K (SEQ ID NO:767); R219Q/S262N/D86L (SEQ ID NO:768); R219Q/S262N/D86M (SEQ ID NO:769); R219Q/S262N/D86N (SEQ ID NO:770); R219Q/S262N/D86P (SEQ ID NO:771); R219Q/S262N/D86Q (SEQ ID NO:772); R219Q/S262N/D86R (SEQ ID NO:773); R219Q/S262N/D86S (SEQ ID NO:774); R219Q/S262N/D86T (SEQ ID NO:775); R219Q/S262N/D86V (SEQ ID NO:776); R219Q/S262N/D86W (SEQ ID NO:777); R219Q/S262N/D86Y (SEQ ID NO:778); R219Q/S262N/E179C (SEQ ID NO:779); R219Q/S262N/E179F (SEQ ID NO:780); R219Q/S262N/E179H (SEQ ID NO:781); R219Q/S262N/E179I (SEQ ID NO:782); R219Q/S262N/E179K (SEQ ID NO:783); R219Q/S262N/E179L (SEQ ID NO:784); R219Q/S262N/E179M (SEQ ID NO:785); R219Q/S262N/E179N (SEQ ID NO:786); R219Q/S262N/E179P (SEQ ID NO:787); R219Q/S262N/E179Q (SEQ ID NO:788); R219Q/S262N/E179R (SEQ ID NO:789); R219Q/S262N/E179W (SEQ ID NO:790); R219Q/S262N/E179Y (SEQ ID NO:791); R219C/S262N (SEQ ID NO:792); R219D/S262N (SEQ ID NO:793); R219E/S262N (SEQ ID NO:794);

R219F/S262N (SEQ ID NO:795); R219G/S262N (SEQ ID NO:796); R219H/S262N (SEQ ID NO:797); R219I/S262N (SEQ ID NO:798); R219L/S262N (SEQ ID NO:799); R219M/S262N (SEQ ID NO:800); R219P/S262N (SEQ ID NO:801); R219S/S262N (SEQ ID NO:802); R219T/S262N (SEQ ID NO:803); R219V/S262N (SEQ ID NO:804); R219W/S262N (SEQ ID NO:805); R219Y/S262N (SEQ ID NO:806); R219Q/S262N/L221C (SEQ ID NO:807); R219Q/S262N/L221D (SEQ ID NO:808); R219Q/S262N/L221E (SEQ ID NO:809); R219Q/S262N/L221F (SEQ ID NO:810); R219Q/S262N/L221H (SEQ ID NO:811); R219Q/S262N/L221I (SEQ ID NO:812); R219Q/S262N/L221K (SEQ ID NO:813); R219Q/S262N/L221M (SEQ ID NO:814); R219Q/S262N/L221N (SEQ ID NO:815); R219Q/S262N/L221P (SEQ ID NO:816); R219Q/S262N/L221Q (SEQ ID NO:817); R219Q/S262N/L221R (SEQ ID NO:818); R219Q/S262N/L221S (SEQ ID NO:819); R219Q/S262N/L221T (SEQ ID NO:820); R219Q/S262N/L221W (SEQ ID NO:821); R219Q/S262N/L221Y (SEQ ID NO:822); R219Q/S262C (SEQ ID NO:823); R219Q/S262D (SEQ ID NO:824); R219Q/S262E (SEQ ID NO:825); R219Q/S262F (SEQ ID NO:826); R219Q/S262G (SEQ ID NO:827); R219Q/S262H (SEQ ID NO:828); R219Q/S262I (SEQ ID NO:829); R219Q/S262K (SEQ ID NO:830); R219Q/S262L (SEQ ID NO:831); R219Q/S262P (SEQ ID NO:832); R219Q/S262Q (SEQ ID NO:833); R219Q/S262R (SEQ ID NO:834); R219Q/S262T (SEQ ID NO:835); R219Q/S262W (SEQ ID NO:836); R219Q/S262Y (SEQ ID NO:837); R219Q/S262N/H264C (SEQ ID NO:838); R219Q/S262N/H264D (SEQ ID NO:839); R219Q/S262N/H264E (SEQ ID NO:840); R219Q/S262N/H264F (SEQ ID NO:841); R219Q/S262N/H264I (SEQ ID NO:842); R219Q/S262N/H264K (SEQ ID NO:843); R219Q/S262N/H264L (SEQ ID NO:844); R219Q/S262N/H264M (SEQ ID NO:845); R219Q/S262N/H264P (SEQ ID NO:846); R219Q/S262N/H264R (SEQ ID NO:847); R219Q/S262N/H264S (SEQ ID NO:848); R219Q/S262N/H264T (SEQ ID NO:849); R219Q/S262N/H264V (SEQ ID NO:850); R219Q/S262N/H264W (SEQ ID NO:851); R219Q/S262N/H264Y (SEQ ID NO:852); R219Q/S262N/S266A (SEQ ID NO:853); R219Q/S262N/S266C (SEQ ID NO:854); R219Q/S262N/S266D (SEQ ID NO:855); R219Q/S262N/S266E (SEQ ID NO:856); R219Q/S262N/S266F (SEQ ID NO:857); R219Q/S262N/S266G (SEQ ID NO:858); R219Q/S262N/S266H (SEQ ID NO:859); R219Q/S262N/S266I (SEQ ID NO:860); R219Q/S262N/S266K (SEQ ID NO:861); R219Q/S262N/S266L (SEQ ID

NO:862); R219Q/S262N/S266M (SEQ ID NO:863); R219Q/S262N/S266N (SEQ ID NO:864); R219Q/S262N/S266P (SEQ ID NO:865); R219Q/S262N/S266Q (SEQ ID NO:866); R219Q/S262N/S266R (SEQ ID NO:867); R219Q/S262N/S266T (SEQ ID NO:868); R219Q/S262N/S266V (SEQ ID NO:869); R219Q/S262N/S266W (SEQ ID NO:870); R219Q/S262N/S266Y (SEQ ID NO:871); R219Q/S262N/K267A (SEQ ID NO:872); R219Q/S262N/K267C (SEQ ID NO:873); R219Q/S262N/K267D (SEQ ID NO:874); R219Q/S262N/K267E (SEQ ID NO:875); R219Q/S262N/K267F (SEQ ID NO:876); R219Q/S262N/K267G (SEQ ID NO:877); R219Q/S262N/K267H (SEQ ID NO:878); R219Q/S262N/K267I (SEQ ID NO:879); R219Q/S262N/K267L (SEQ ID NO:880); R219Q/S262N/K267M (SEQ ID NO:881); R219Q/S262N/K267N (SEQ ID NO:882); R219Q/S262N/K267P (SEQ ID NO:883); R219Q/S262N/K267Q (SEQ ID NO:884); R219Q/S262N/K267R (SEQ ID NO:885); R219Q/S262N/K267S (SEQ ID NO:886); R219Q/S262N/K267T (SEQ ID NO:887); R219Q/S262N/K267V (SEQ ID NO:888); R219Q/S262N/K267W (SEQ ID NO:889); R219Q/S262N/K267Y (SEQ ID NO:890); R219Q/S262N/V296A (SEQ ID NO:891); R219Q/S262N/V296C (SEQ ID NO:892); R219Q/S262N/V296D (SEQ ID NO:893); R219Q/S262N/V296E (SEQ ID NO:894); R219Q/S262N/V296F (SEQ ID NO:895); R219Q/S262N/V296G (SEQ ID NO:896); R219Q/S262N/V296H (SEQ ID NO:897); R219Q/S262N/V296I (SEQ ID NO:898); R219Q/S262N/V296K (SEQ ID NO:899); R219Q/S262N/V296L (SEQ ID NO:900); R219Q/S262N/V296M (SEQ ID NO:901); R219Q/S262N/V296N (SEQ ID NO:902); R219Q/S262N/V296P (SEQ ID NO:903); R219Q/S262N/V296Q (SEQ ID NO:904); R219Q/S262N/V296R (SEQ ID NO:905); R219Q/S262N/V296S (SEQ ID NO:906); R219Q/S262N/V296T (SEQ ID NO:907); R219Q/S262N/V296W (SEQ ID NO:908); R219Q/S262N/V296Y (SEQ ID NO:909); R219Q/K11A/R20A (SEQ ID NO:910); R219Q/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:911); R219Q/R20A/K371A (SEQ ID NO:912); R219Q/K11A/K371A (SEQ ID NO:913); S262N/K11A/R20A (SEQ ID NO:914); S262N/K11A/R20A/K371A (SEQ ID NO:915); S262N/R20A/K371A (SEQ ID NO:916); и S262N/K11A/K371A (SEQ ID NO:917).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фигурах 1A-1F** приведены примеры выравнивания белка-предшественника человеческой аденозиндезаминазы 2 (ADA2), приведенной в SEQ ID NO:2 (остатки 30-511, соответствующие зрелой ADA2, приведенной в

SEQ ID NO: 5), с другими белками ADA2. "*" означает, что выровненные остатки являются идентичными, ":" означает, что выровненные остатки не являются идентичными, но являются аналогичными и содержат консервативные аминокислотные остатки в выровненном положении, и "." означает, что выровненные остатки являются аналогичными и содержат полуконсервативные аминокислотные остатки в выровненном положении. Остатки, соответствующие предполагаемому домену связывания с рецептором (PRB), подчеркнуты. Неограничивающие примеры соответствующих положений для аминокислотных замен выделены цветом. Например, на **Фигуре 1A** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 шимпанзе, приведенной в SEQ ID NO:286. На **Фигуре 1B** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 гориллы, приведенной в SEQ ID NO:287. На **Фигуре 1C** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 карликового шимпанзе, приведенной в SEQ ID NO:288. На **Фигуре 1D** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 суматранского орангутана, приведенной в SEQ ID NO:289. На **Фигуре 1E** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 северного белощёкого гиббона, приведенной в SEQ ID NO:290. На **Фигуре 1F** приведено выравнивание ADA2, приведенной в SEQ ID NO:2, с ADA2 макака-крабоеда, приведенной в SEQ ID NO:291.

На **Фигуре 2** изображен биосинтез и катаболизм внеклеточного аденозина, а также сигналинг от аденозинового рецептора (адаптировано из Antonioli *et al.* (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Физиологические состояния, такие как гипоксия, ишемия, воспаление, опухолевое окружение или травма, могут способствовать внеклеточному накоплению ATP, который метаболизируется в AMP ферментом клеточной поверхности CD39. AMP в свою очередь метаболизируется в аденозин молекулой CD73. Внеклеточный аденозин может связываться с четырьмя разными аденозиновыми рецепторами, связанными с G-белком (ADR; т.е., A1, A2A, A2B и A3), экспрессируемыми на клеточной поверхности расположенных поблизости иммунных, опухолевых или других клеток, и таким образом участвовать в различных нисходящих аденозин-опосредованных сигнальных активностях и сигналинге, например, вызывать

иммуносупрессию, пролиферацию раковых клеток, миграцию и/или метастазирование раковых клеток, ангиогенез и другие эффекты. Транспортеры нуклеозидов (NT) облегчают проникновение внеклеточного аденозина внутрь клеток. Аденозиндезаминаза 2 (ADA2), в том числе экзогенная ADA2 или варианты, предусмотренные в настоящем документе, способна расщеплять внеклеточный аденозин, катализируя превращение аденозина в инозин.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

План

A. Определения

B. Аденозиндезаминаза 2 (ADA2) и модулирование опосредованной аденозином иммуносупрессии опухоли

1. Иммунитет против опухоли и ускользание от иммунологического надзора

2. Иммуномодуляция аденозином в раковом и опухолевом микроокружении (TME)

3. Аденозиндезаминаза и направленное действие на аденозин в лечении рака

C. Аденозиндезаминаза 2 (ADA2) и ее варианты

1. Структура и активность ADA2

a. Структура ADA2

b. Активности ADA2

2. Варианты ADA2

a. Примеры модификаций

i. Аминокислотные замены

ii. Модификация (модификации) PRB домена

iv. Гипергликозилирование

b. Молекулы нуклеиновых кислот

c. Получение вариантов белков ADA2

D. ADA2 конъюгаты и белки слияния

1. Удлиняющие время полужизни фрагменты

a. Полипептиды низкой сложности

b. С-концевой пептид (CTP) β субъединицы человеческого хорионического гонадотропина

c. Константная область иммуноглобулина (Fc) или ее части

d. Альбумин или его фрагмент или его вариант

e. Альбумин-связывающий фрагмент

f. Последовательности PAS

g. Последовательности HAP

h. Последовательности XTEN

i. Трансферрин или его фрагмент

j. Конъюгация с полимерами

i. Полиэтиленгликоль (PEG)

ii. Гидроксиэтиловый крахмал (HES)

iii. Полисиаловые кислоты (PSA)

iv. Другие полимеры

2. Способы получения конъюгатов или белков слияния

Линкеры

i. Пептидные линкеры

ii. Гетеробифункциональные связывающие агенты

E. Способы получения нуклеиновых кислот, кодирующих ADA2, и полипептидов

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды ADA2

2. Создание мутанта или модифицированной нуклеиновой кислоты и кодируемых полипептидов

3. Векторы и клетки

Иммунные клетки, которые кодируют и экспрессируют варианты ADA2, предусмотренные в настоящем документе

4. Экспрессия

a. Прокариотические клетки

b. Дрожжевые клетки

c. Клетки насекомых

d. Клетки млекопитающих

e. Растения

5. Методы очистки

F. Способы оценки активности и физических свойств ADA2

1. Оценка аденозиндезаминазы

2. Способы оценки связывания с гепарином

a. Оценка аффинности

b. Оценка с помощью ELISA

c. Дот-блоттинг и другие анализы связывания радиоактивно меченного гепарина

3. Способы оценки стабильности

a. Условия

i. Стабильность в плазме

ii. Термостабильность

iii. Стабильность в зависимости от pH или в оптимуме pH

iv. Другие условия

b. Определение физических свойств

i. Ферментативная активность

ii. Хроматографический анализ чистоты белка
iii. Дифференциальная сканирующая калориметрия
iv. Дифференциальная сканирующая флуориметрия
v. Спектроскопия собственной флуоресценции
vi. Круговой дихроизм
vii. Динамическое светорассеяние
viii. Статическое светорассеяние
ix. Измерения мутности
x. Другие способы для определения стабильности

4. Оценка терапевтической активности
   a. Тесты *in vitro*
   b. *In vivo* модели на животных
      i. Метаболическая активность опухоли
      ii. Размер и объем опухоли
   c. Клинический мониторинг
5. Фармакодинамика/фармакокинетика и переносимость

G. Фармацевтические композиции и лекарственные формы
1. Лекарственные формы – жидкие, инъецируемые, эмульсии Лиофилизированные порошки
2. Композиции для других способов введения
3. Дозировки и способы введения
4. Упаковка и готовые изделия

H. Способы лечения аденозиндезаминазой 2 (ADA2)
1. Примеры заболевания и состояний
   a. Виды рака и опухоли
   b. Нераковые гиперпролиферативные заболевания
   c. Фиброзные заболевания
   d. Инфекционные заболевания
   e. Другие заболевания и состояния
2. Способы выбора пациента
   a. Аденозин-ассоциированные биомаркеры
      i. Уровни аденозина в плазме
      ii. Аденозиновые рецепторы (ADR)
      iii. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73
   b. Выбор пациентов
3. Дозировки и способы введения
4. Комбинированная терапия
   a. Противораковые агенты
      i. Противораковые антитела
      ii. Химиотерапевтические агенты

iii. **Лучевая терапия**

iv. **Антиангиогенные агенты**

v. **Ингибиторы иммунных контрольных точек**

(a) **Терапевтические агенты против CTLA4**

(b) **Терапевтические агенты против PD-1 и PD-L1**

b. **Другие иммуномодулирующие агенты**

c. **Деградирующий гиалуронан фермент**

Растворимые деградирующие гиалуронан ферменты (*например,* растворимый PH20)

d. **Антитела для лечения инфекционных заболеваний**

e. **Антибиотики и противогрибковые агенты**

I. Примеры

A. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не определено иначе, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится (относятся) изобретение (изобретения). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, которые упоминаются во всем описании в настоящем документе, если не указано иное, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В том случае, если существует множество определений для терминов в настоящем документе, предпочтительными являются определения, указанные в этом разделе. Когда ссылка дается на URL или другой такой идентификатор или адрес, следует понимать, что такие идентификаторы могут измениться и конкретная информация в интернете может появляться и исчезать, но эквивалентная информация известна и ее можно легко найти путем поиска в интернете. Ссылка на это указывает на доступность и публичное распространение такой информации.

Использованный в настоящем документе термин "аденозин" относиться к пуриновому нуклеозиду, состоящему из молекулы аденина, присоединенной к фрагменту молекулы сахара рибозы (рибофураноза) посредством β-N_9-гликозидной связи. Аденозин может модулировать различные физиологические процессы, взаимодействуя с аденозиновыми рецепторами.

Использованный в настоящем документе термин "константа Михаэлиса" или K_m является показателем концентрации субстрата, необходимой для прохождения эффективного катализа. Например, для фермента с высокой K_m может потребоваться более высокая концентрация субстрата для достижения заданной скорости реакции по сравнению с ферментом с более низкой K_m в отношении субстрата. K_m может отражать аффинность фермента в отношении субстрата.

Использованный в настоящем документе термин "каталитическая эффективность" означает эффективность, с которой фермент реагирует с субстратом с образованием продукта. Каталитическая эффективность выражается как k_{cat}/K_m ($M^{-1}c^{-1}$ или 1/Ms). Способы оценки кинетических параметров каталитической активности, включая k_{cat}/K_m, хорошо известны специалистам в данной области техники. Обычно, k_{cat}/K_m измеряют в стационарных условиях.

Использованный в настоящем документе термин "аденозиндезаминаза" или "ADA" относится к ферменту, который катализирует гидролитическое дезаминирование аденозина до инозина. ADA также может дезаминировать 2'дезоксиаденозин до 2'дезоксиинозина, и, таким образом, ферменты проявляют активность 2'дезоксиаденозиндезы. У человека существует две изоформы ADA, обозначаемые ADA1 и ADA2, которые отличаются молекулярной массой, каталитическими параметрами и другими свойствами.

Использованный в настоящем документе термин "аденозиндезаминаза 1" или ADA1 относится к ADA, у которой отсутствует сигнальный пептид и которая повсеместно экспрессируется внутри клеток. Продуцируется в форме мономера. Примером ADA1 является человеческая ADA1, имеющая последовательность нуклеотидов, приведенную в SEQ ID NO: 11 и кодирующую последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 12. У человека, ADA1 дикого типа характеризуется K*m*, равной или примерно равной $5,2 \times 10^{-5}$ М, имеет оптимум pH от или примерно от 7 до 7,5 и обладает схожей аффинностью в отношении к аденозина и 2'дезоксиаденозина. Например, для ADA1 соотношение 2'дезоксиаденозин/аденозиндезаминаза составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 0,70, так, по меньшей мере,

или, по меньшей мере, примерно 0,75. Ссылка на ADA1 включает ADA1 дикого типа или нативную, встречающуюся у млекопитающих, в том числе у человека и у субъектов, не относящихся к человеку. Например, ссылка на ADA1 включает человеческую ADA1, которая содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 12. Ссылка на ADA1 также включает ее варианты, такие как аллельные варианты, межвидовые варианты, сплайс-варианты и другие варианты, которые включают полипептид, имеющий последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, и обладает активностью аденозиндезаминазы.

Использованный в настоящем документе термин "аденозиндезаминаза 2" или "ADA2" относится к ADA, присутствующей во внеклеточном окружении, в том числе в плазме крови. ADA2 образуется из полипептида-предшественника, содержащего сигнальный пептид (например, ADA2, приведенная в SEQ ID NO:2), который удаляется с образованием зрелого белка, у которого отсутствует сигнальный пептид (например, ADA2, приведенная в SEQ ID NO: 5). Секретируемая ADA2 представляет собой гомодимер, содержащий две идентичные полипептидные цепи, которые взаимодействуют посредством неполярных взаимодействий между остатками каждой субъединицы. У человека, ADA2 дикого типа характеризуется Km, равной или примерной равной 200 x 10^{-5} M, имеет оптимум pH, равный или примерной равный 6,5 ± 0,2, и обладает слабой аффинностью в отношении 2'дезоксиаденозина. Например, для ADA2 соотношение 2'дезоксиаденозин/аденозиндезаминаза меньше 0,40, так например, меньше или примерно меньше, чем 0,30, или меньше или примерно меньше, чем 0,25. Ссылка на ADA2 включает ADA2 дикого типа или нативную, встречающуюся у млекопитающих, в том числе у человека и у субъектов, не относящихся к человеку. Например, ссылка на ADA2 включает человеческую ADA2, которая содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:2, зрелую форму, приведенную в SEQ ID NO: 5, ее каталитически активные части из SEQ ID NO: 5 и ее димерные формы. Ссылка на ADA2 также включает форму-

предшественника, зрелые формы, каталитические активные формы и димерные формы, являющиеся ее вариантами, такие как аллельные варианты, межвидовые варианты, сплайс-варианты и другие варианты, которые включают полипептид, имеющий последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с полипептидом-предшественником, приведенным в SEQ ID NO:2 или его зрелой формой, приведенной в SEQ ID NO: 5, и которая в активной форме обладает активностью аденозиндезаминазы. Такие варианты в активной форме обладают, по меньшей мере, 40%, 50%, 70%, 90%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или большей активностью по сравнению с активностью нативного полипептида ADA2 или полипептида ADA2 дикого типа. Использованный в настоящем документе термин “дикий тип” или “нативный” со ссылкой на ADA2 относится к белку ADA2, содержащему полипептид, кодируемый нативным или встречающимся в природе геном ADA2, включая аллельные варианты, встречающиеся в организме, в том числе у человека и других животных, в природе. Ссылка на ADA2 дикого типа без ссылки на вид включает ADA2 дикого типа любых видов. Полипептиды ADA2 дикого типа включают кодируемый полипептид-предшественник, его фрагменты и его процессированные формы, такие как зрелая форма без сигнального пептида, а также любые его пре- или посттрансляционно процессированные или модифицированные формы. Нативные белки ADA2 также включают те белки, которые посттрансляционно модифицированы, в том числе гликозилированы, карбоксилированы и гидроксилированы, но не ограничиваясь этим. Нативные белки ADA2 также включают мономер полипептида, а также димерные формы. Например, у человека экспрессируется нативная ADA2. Человеческая ADA2 дикого типа приведена в SEQ ID NO:2 (предшественник) и в SEQ ID NO: 5 (зрелая) и включает ее каталитически активные формы, описанные в настоящем документе, и аллельные варианты (предшественник или зрелая), приведенные в любой из SEQ ID NO:376-383, или изоформы ADA2, например, ADA2,

приведенная в SEQ ID NO:68. Нативная ADA2 или ADA2 дикого типа из видов, не относящихся к человеку, включает, но не ограничиваясь, ADA2 из *Pan troglodytes* (шимпанзе; форма-предшественник SEQ ID NO:286, зрелая форма SEQ ID NO:326; NCBI Acc. No. XP_003317127.1); *Gorilla gorilla* (горилла; форма-предшественник SEQ ID NO:287, зрелая форма SEQ ID NO:327; NCBI Acc. No. XP_004063024.1); *Pan paniscus* (карликовый шимпанзе; форма-предшественник SEQ ID NO:288, зрелая форма SEQ ID NO:328; NCBI Acc. No. XP_003828345.1); *Pongo abelii* (суматранский орангутан; форма-предшественник SEQ ID NO:289, зрелая форма SEQ ID NO:329; NCBI Acc. No. NP_001125360.1); *Nomascus leucogenys* (северный белощёкий гиббон; форма-предшественник SEQ ID NO:290, зрелая форма SEQ ID NO:330; NCBI Acc. No. XP_004088517.1); *Macaca fascicularis* (макак-крабоед; форма-предшественник SEQ ID NO:291, зрелая форма SEQ ID NO:331; NCBI Acc. No. XP_005568111.1); *Chlorocebus sabaeus* (зеленая мартышка; форма-предшественник SEQ ID NO:292, зрелая форма SEQ ID NO:332; NCBI Acc. No. XP_007972990.1); *Macaca mulatta* (макак-резус; форма-предшественник SEQ ID NO:293, 337, зрелая форма SEQ ID NO:333, 340; GenBank Acc. Nos. AFH32795.1, EHH20002.1); *Callithrix jacchus* (игрунка; форма-предшественник SEQ ID NO:294, 374, зрелая форма SEQ ID NO:334, 375; NCBI Acc. No. XP_009004591.1, XP_009004586.1); *Xenopus laevis* (гладкая шпорцевая лягушка; форма-предшественник SEQ ID NO:295, зрелая форма SEQ ID NO:335; NCBI Acc. No. NP_001090531.1); *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка; форма-предшественник SEQ ID NO:296-300, зрелая форма SEQ ID NO:336, 338, 339; AAL40913.1, AAL40920.1, AAL40911.1, AAL40912.1 и AAL40910.1); *Bombyx mori* (тутовый шелкопряд; форма-предшественник SEQ ID NO:301, зрелая форма SEQ ID NO:341; NCBI Acc. No. NP_001098698.1); и *Sarcophaga perigrina* (мясная муха; форма-предшественник SEQ ID NO:302, зрелая форма SEQ ID NO:342; GenBank Acc. No. BAA11812.1).

Использованный в настоящем документе термин предшественник ADA2 относится к не секретируемой форме ADA2, которая содержит N-концевой сигнальный пептид, направляющий белок на секрецию. Сигнальный пептид отщепляется в эндоплазматическом ретикулуме. Примером полипептида-предшественника ADA2 является полипептид, приведенный в SEQ ID NO:2, или

его аллельные или межвидовые варианты или другие его варианты, например, те, которые приведены в любой из SEQ ID NO:286-302, 337 или 376-379.

Использованный в настоящем документе термин "зрелая ADA2" относится к ADA2, у которой отсутствует сигнальная последовательность. Пример зрелой ADA2 приведен в SEQ ID NO: 5, и также включает ее варианты, такие как межвидовые и аллельные варианты и другие варианты, например, те, которые приведены в любой из SEQ ID NO:326-336, 338-342, 375 и 380-383. Ссылка на зрелую ADA2 включает ее димерные формы.

Использованный в настоящем документе термин межвидовые варианты относится к вариантам полипептидам, встречающимся у разных видов, в том числе у разных видов млекопитающих, таких как мышь и человек.

Использованный в настоящем документе термин аллельные варианты относится к вариантам белка, встречающимся у представителей одного вида.

Использованный в настоящем документе термин домен (как правило, последовательность из трех или более, обычно 5 или 7 или больше аминокислот) относится к части молекулы, такой как белки или кодирующие нуклеиновые кислоты, которая структурно и/или функционально отличается от других частей молекулы и может быть идентифицирована. Например, домены включают те части полипептидной цепи, которые могут образовывать независимо фолдированную структуру в белке, состоящую из одного или нескольких структурных фрагментов, и/или которые могут быть распознаны по функциональной активности, такой как протеолитическая активность. Белок может иметь один или более одного отличных друг от друга доменов. Например, домен можно идентифицировать, определить или отличить по гомологии последовательности с последовательностью родственных представителей семейства, например, по гомологии с фрагментами, которые считаются протеазным доменом. В другом примере, домен можно отличить по его функции, такой как протеолитическая активность, или способности взаимодействовать с биомолекулой, например, связывание с ДНК, связывание с лигандом и димеризация. Домен независимо может обладать биологической функцией или активностью, например, домен независимо или будучи слитым с другой молекулой может проявлять активность, такую как, например,

протеолитическая активность или связывание с лигандом. Домен может представлять собой линейную последовательность аминокислот или не линейную последовательность аминокислот. Многие полипептиды содержат множество доменов. Такие домены известны и могут быть идентифицированы специалистами в данной области техники. С целью пояснения в настоящем документе даны определения, но нужно понимать, что конкретные домены могут быть распознаны по названию. При необходимости для идентификации доменов можно использовать соответствующее программное обеспечение.

Использованный в настоящем документе термин "каталитический домен" или "ADA домен" относится к домену, который обеспечивает активность аденозиндезаминазы. Каталитический домен фермента обладает всеми необходимыми свойствами, которые требуются белку для осуществления его ферментативной активности, такой как активность аденозиндезаминазы. Домен ADA структурно состоит из параллельных β-листов из восьми цепей, свернутых в бочонок и окруженных классическим фрагментом α/β-TIM бочонок из спиралей и пяти дополнительных спиралей, расположенных между β1 и α1 (H1, H2 и H3) и C-концом (H4 и H5) (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). Петли между β-цепями и α-спиралью содержат много остатков активного центра, необходимых для осуществления активности. Остатки активного центра включают остатки, которые координируют связывание с цинком, остатки доноры и акцепторы протона в активном центре и остатки связывания с субстратом. Примеры таких остатков в человеческой ADA2 приведены в Таблице 4. В человеческом ADA2, домен ADA содержится в области, соответствующей остаткам 106-502 аминокислотной последовательности предшественника, приведенной в SEQ ID NO:2 (соответствует остаткам 77-473 зрелого белка, приведенного в SEQ ID NO: 5), за исключением того, что остатки, соответствующие предполагаемому домену связывания с рецептором (PRB), содержащиеся в нем, не нужны для каталитической активности.

Использованный в настоящем документе термин "его каталитически активная часть" или "его каталитически активный фрагмент" относится к полипептиду ADA2, который содержит не полноразмерную последовательность

зрелого полипептида ADA2, но содержит непрерывную часть аминокислот из ADA2, включая каталитический домен целиком или часть каталитического домена, достаточный для осуществления активности аденозиндезаминазы. Например, каталитически активная часть ADA2 включает полипептид, содержащий непрерывную последовательность аминокислот зрелой последовательности полипептида ADA2, которая включает аминокислотные остатки, соответствующие остаткам 83, 85, 327, 330, 355 и 412 со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5, но не включает полную аминокислотную последовательность зрелого полипептида ADA2. Например, каталитически активная часть включает полипептид, содержащий непрерывную последовательность аминокислот зрелой последовательности ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5, которая включает аминокислотные остатки 83, 85, 327, 330, 355 и 412, но не включает полноразмерную последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5. ADA2, которая содержит каталитически активную часть полипептида ADA2, когда находится в активной форме, обладает, по меньше мере, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше от активности, например, по меньшей мере, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше от активности ADA2, содержащей полноразмерный зрелый полипептид ADA2. В одном из примеров, каталитически активная часть полипептида ADA2 включает полипептид, у которого отсутствует весь предполагаемый домен связывания с рецептором или его часть (PRB). В другом примере, каталитически активная часть полипептида ADA2 включает полипептид, у которого отсутствует одна или несколько С-концевых аминокислот зрелого полипептида, т.е., укороченный с С-конца на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 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 или более непрерывных С-концевых аминокислотных остатков по сравнению со зрелым полипептидом ADA2. Понятно, что ссылка в настоящем документе на вариант ADA2 или его каталитически активную часть означает, что каталитически активная часть

содержит модификацию (модификации) (*например,* аминокислотная замена (аминокислотные замены)).

Использованный в настоящем документе термин "предполагаемый домен связывания с рецептором" или "PRB домен" относится к части ADA2, которая образует независимо фолдированную структуру, состоящую из α- и β-слоя, содержащего три цепи антипараллельных β-листов, обозначаемых SR1-SR2-SR3, окруженных HR и частично H2 α-спиралями с одной стороны и пролин-богатой SR2-SR3 петлей с другой стороны (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). PRB домен содержит консервативные остатки цистеина, которые образуют дисульфидную связь между C137 и C159 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (положения C108 и C130 зрелой ADA2, приведенного в SEQ ID NO: 5). Сообщается, что PRB домен участвует в связывании ADA2 с его рецепторами. Понятно, что конкретные остатки, образующие домен, могут отличаться (*например,* длиннее или короче), например, в зависимости от способов, используемых для идентификации домена. Сообщается, что в человеческом ADA2, PRB домен соответствует остаткам 127-185 или 134-177 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (остатки 98-156 или 105-148, соответственно, зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5).

Использованный в настоящем документе термин белок, у которого отсутствует домен целиком или часть домена, например, PRB домен целиком или часть PRB домена, относится к полипептиду, который содержит делецию одной или нескольких аминокислот или всех аминокислот домена, такого как PRB домен, по сравнению с белком сравнения или немодифицированным белком. В полипептиде, у которого отсутствует домен целиком или часть домена могут быть удалены непрерывные аминокислоты, но удаленные аминокислоты не обязательно должны быть смежными аминокислотами в пределах домена родственного полипептида. У полипептидов, у которых отсутствует домен целиком или часть домена, может быть утрачена или снижена активность полипептида по сравнению с активностью белка сравнения или немодифицированного белка.

Использованный в настоящем документе термин "активная форма" относится к любому ферменту ADA2, который обладает активностью аденозиндезаминазы. Активная форма фермента может содержать полноразмерную последовательность аминокислот или может представлять его каталитически активную часть. Активная форма фермента может представлять собой мономер или димер. Как правило, активная форма представляет собой димер. Активной формой является любая форма, которая обладает каталитической эффективностью (k_{cat}/K_M), равной, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 6 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 7 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 8 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 9 x 10^3 $M^{-1}c^{-1}$, 1 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 2 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 3 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 4 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 5 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 6 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 7 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 8 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 9 x 10^4 $M^{-1}c^{-1}$, 1 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 2 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 3 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 4 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 5 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 6 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 7 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 8 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 9 x 10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 1 x 10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 2 x 10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 3 x 10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 4 x 10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 5 x 10^6 $M^{-1}c^{-1}$ или больше.

Использованный в настоящем документе термин "мультимер" относится к молекуле, состоящей из нескольких идентичных или разных субъединиц, удерживаемых вместе или ассоциированных, например, за счет нековалентных взаимодействий.

Использованный в настоящем документе термин "димер" относится к молекуле, которая содержит два полипептида, связанных вместе. Как правило, полипептиды связаны нековалентно. Например, димер ADA2 образован неполярными межсубъединичными взаимодействиями, включая гидрофобные взаимодействия, между остатками двух полипептидов.

Использованный в настоящем документе термин "гомодимер" относится к димеру, который образован двумя идентичными полипептидами.

Использованный в настоящем документе термин "гетеродимер" относится к димеру, который образован двумя разными полипептидами.

Использованный в настоящем документе термин "мономер" относится к единственной единице белка или полипептида. Молекулярная масса мономера относительно низкая по сравнению с димерами или другими мультимерами. Мономер может существовать независимо, или он может быть ассоциирован с другими молекулами с образованием димера или другого мультимера.

Использованный в настоящем документе термин "соответствующая форма" со ссылкой на белок ADA2 означает, что при сравнении свойств и активности двух белков ADA2, свойство сравнивают, используя такую же структурную форму белка. Например, если говорится, что белок ADA2 обладает меньшей активностью по сравнению с активностью соответствующей формы первого белка ADA2, это означает, что конкретная форма, такая как димер, обладает меньшей активностью по сравнению с димером первого белка ADA2.

Использованный в настоящем документе термин "полипептид" относится к линейному органическому полимеру, содержащему больше число аминокислотных остатков, связанных вместе в цепь, образующую часть белковой молекулы или белковую молекулу целиком.

Использованный в настоящем документе термин "белок" или "белковая молекула" или их вариации относится к большой молекуле, состоящей из одной или нескольких полипептидных цепей, построенных из линейной последовательности аминокислот. Таким образом, белок может представлять собой мономер или может представлять собой димер или другой мультимер. Белок может обладать структурной, механической, биохимической или сигнальной активностью.

Использованный в настоящем документе термин "субъединица полипептида" или "субъединица белка" относится к отдельному полипептиду или мономеру, который может ассоциировать с другими полипептидами или мономерами с образованием белковой молекулы, представляющей собой мультимерный комплекс. Одна субъединица построена из одной полипептидной цепи.

Использованный в настоящем документе термин "вариант белка ADA2" относится к белку ADA2, включая любые его формы, такие как полноразмерная, каталитически активная часть, мономер или димер, который имеет одно или больше аминокислотных различий по сравнению с немодифицированным белком ADA2. Одно или несколько аминокислотных различий могут представлять собой аминокислотные мутации, такие как одна или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций, или могут представлять собой вставки или делеции целых доменов, и любые их комбинации. Как правило,

вариант белка ADA2 имеет одну или несколько модификаций в первичной последовательности по сравнению с немодифицированным белком ADA2. Например, предусмотренный в настоящем документе вариант ADA2 может иметь, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или больше аминокислотных различий по сравнению с немодифицированным белком ADA2. Рассматривается любая модификация, при условии, что полученный белок обладает активностью аденозиндезаминазы.

Использованный в настоящем документе термин модификация относится к модификации последовательности аминокислотных остатков полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот и нуклеотидов, соответственно. Модификации также могут включать посттрансляционные модификации или другие изменения в молекуле, которые могут возникать из-за конъюгации или связывания, напрямую или не напрямую, с другим фрагментом. Способы модифицирования полипептида являются обычными для специалистов в данной области техники, такие как, с использованием методик рекомбинантных ДНК.

Использованный в настоящем документе термин “делеция” в отношении модификации последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, относится к удалению одного или нескольких нуклеотидов или одной или нескольких аминокислот по сравнению с последовательностью, такой как последовательность целевого полинуклеотида или полипептида, или нативная последовательность или последовательность дикого типа.

Использованный в настоящем документе термин “вставка” в отношении модификации последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности описывает включение одного или нескольких дополнительных нуклеотидов или одной или нескольких дополнительных аминокислот в целевую, нативную последовательность, последовательность дикого типа или другую соответствующую последовательность. Таким образом, аминокислотная молекула или молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит одну или несколько вставок по сравнению с последовательностью дикого типа, содержит один или несколько дополнительных аминокислот или

один или несколько дополнительных нуклеотидов в линейной длине последовательности.

Использованный в настоящем документе термин “добавления” к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислот описывают дополнение нуклеотидов или аминокислот к любому концу по сравнению с другой последовательностью.

Использованный в настоящем документе термин “замена” в отношении модификации относится к замещению одного или нескольких нуклеотидов или одной или нескольких аминокислот в нативной, целевой последовательности, последовательности дикого типа или другой последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида на альтернативный нуклеотид или аминокислоту, без изменения длины (выраженной числом остатков) молекулы. Таким образом, одна или несколько замен в молекуле не изменяет число аминокислотных остатков или нуклеотидов молекулы. Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены в виде номера аминокислотного остатка по длине последовательности полипептида или последовательности полипептида сравнения. Например, модифицированный полипептид, имеющий модификацию аминокислоты в 19-ом положении аминокислотной последовательности, представляющую собой замену изолейцина (Ile; I) на цистеин (Cys; C), может быть выражен как "замена на Cys или C в положении, соответствующем положению 19", I19C, Ile19Cys или просто C19, чтобы обозначить, что аминокислота в модифицированном 19-ом положении представляет собой цистеин. В этом примере, молекула, имеющая замену, имеет модификацию в Ile 19 немодифицированного полипептида.

Использованный в настоящем документе термин “немодифицированный полипептид” или “немодифицированная ADA2” и его грамматические варианты относятся к исходному полипептиду, выбранному для модификации, как предусмотрено в настоящем документе. Исходный полипептид может представлять собой встречающуюся в природе, дикую форму полипептида. Примером немодифицированного полипептида ADA2 является человеческая ADA2, приведенная в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активная форма. Кроме того, исходный полипептид может быть изменен или мутирован таким

образом, что он отличается от нативной изоформы дикого типа, но, тем не менее, является в настоящем документе исходным немодифицированным полипептидом для модифицированных полипептидов, получаемых из него впоследствии в настоящем документе. Таким образом, существующие известные в данной области техники белки, которые были модифицированы таким образом, чтобы достичь желаемого увеличения или уменьшения конкретной активности или свойства по сравнению с немодифицированным белком сравнения, могут быть выбраны и использованы в качестве исходного немодифицированного полипептида. Например, белок, полученный путем модификации из его нативной формы за счет изменения одной или нескольких единичных аминокислот, желаемое свойство которого было увеличено или уменьшено, например, путем модификация аминокислотного остатка или остатков для изменения гликозилирования, может быть выбран в качестве целевого белка, называемого в настоящем документе немодифицированным, для дальнейшего модифицирования либо того же самого, либо другого свойства.

Использованный в настоящем документе термин "соответствующие остатки" относится к остаткам, которые встречаются в выровненном локусе. Для целей настоящего документа, аминокислотная последовательность белка выравнивается с белком-предшественником ADA2, приведенным в SEQ ID NO:2, или с его зрелой формой, приведенной в SEQ ID NO: 5 (смотрите Фигуру 1), или с последовательностью ADA2, используемой для нумерации по Zavialov, нумерации остатков, использованной в Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377 и номера доступа в PDB 3LGG и 3LGD, приведенной в SEQ ID NO:4. Родственные полипептиды или варианты полипептидов выравнивают любым способом, известным специалистам в данной области техники. Такие способы, как правило, максимизируют совпадения, и включают способы, такие как, выравнивание вручную и с использованием многочисленных доступных программ для выравнивания (например, BLASTP) и других, известных специалистам в данной области техники. Путем выравнивания последовательностей полипептидов специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве гидов. Как правило,

перечисление того, что аминокислоты полипептида соответствуют аминокислотам в раскрытой последовательности, относится к аминокислотам, идентифицированным путем выравнивания полипептида с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности или гомологии (если выравниваются консервативные аминокислоты) с использованием стандартного алгоритма для выравнивания, такого как алгоритм GAP.

Использованный в настоящем документе термин “свойство” ADA2 относится к физическому или структурному свойству, такому как пространственная структура, pI, время полужизни, конформация и другие такие физические характеристики.

Использованный в настоящем документе термин “активность” ADA2 или “активность ADA2” относится к любой активности, которой обладает активная форма белка ADA2, как правило, димерная форма. Такие активности могут быть протестированы *in vitro* и/или *in vivo* и включают активность аденозиндезаминазы, активность фактора роста, способность связываться с гепарином и/или способность связываться с аденозиновым рецептором (ADR), но не ограничиваясь этим. Активность можно оценить *in vitro* или *in vivo*, используя известные анализы, например, измеряя активность аденозиндезаминазы *in vitro* или *in vivo*. Результаты таких анализов указывают на то, что полипептид обладает активностью, которую можно сравнить с активностью полипептида *in vivo*, где *in vivo* активность может относиться к биологической активности. Анализы для определения функциональности или активности модифицированных форм ADA2 известны специалистам в данной области техники, и примеры анализов описаны в настоящем документе.

Использованный в настоящем документе термин "активность аденозиндезаминазы" относится к способности фермента катализировать гидролитическое дезаминирование аденозина до инозина. Активность ADA2 можно оценить, напрямую или не напрямую, путем измерения скорости образования продукта ферментативной реакции. Например, образование инозина или аммония может быть измерено напрямую или не напрямую. В других примерах, измеряют уменьшение субстрата фермента, *например,* аденозина или 2-дезоксиаденозина. Анализы для оценки активности

аденозиндезаминазы известны специалистам в данной области техники и включают анализы, в которых уменьшение субстрата или увеличение продукта измеряют напрямую с помощью спектрофотометра или не напрямую с помощью последующих ферментативных или окислительно-восстановительных реакций, в которых используются хромогенные субстраты или изменения спектра поглощения реакции, но, не ограничиваются этим.

Использованный в настоящем документе термин "увеличенная активность аденозиндезаминазы" относится к увеличенной способности белка ADA2, например, варианта белка ADA2, проявлять активность аденозиндезаминазы по сравнению с белком сравнения. Например, способность варианта белка ADA2 проявлять активность аденозиндезаминазы может быть больше, чем активность аденозиндезаминазы немодифицированного белка ADA2. Активность аденозиндезаминазы может быть увеличена, по меньшей мере, примерно на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или больше по сравнению с активностью аденозиндезаминазы белка сравнения или немодифицированного белка.

Использованный в настоящем документе термин сайт гликозилирования относится аминокислотному положению в полипептиде, к которому может быть присоединен углеводный фрагмент. Как правило, гликозилированный белок содержит один или несколько аминокислотных остатков, таких как аспарагин или серин, для присоединения углеводных фрагментов.

Использованный в настоящем документе термин нативный сайт гликозилирования относится к аминокислотному положению, к которому присоединяется углеводный фрагмент в полипептиде дикого типа. В ADA2 существует четыре N-связанных нативных сайта гликозилирования, соответствующих остаткам N98, N145, N156 и N349 со ссылкой на SEQ ID NO: 5.

Использованный в настоящем документе термин не нативный сайт гликозилирования относится к аминокислотному положению, к которому присоединяется углеводный фрагмент в модифицированном полипептиде, отсутствующий в полипептиде дикого типа. Не нативные сайты

гликозилирования могут быть введены в полипептид ADA2 путем аминокислотных замен. Сайты O-гликозилирования могут быть созданы, например, путем аминокислотной замены нативного остатка на серин или треонин. Сайты N-гликозилирования могут быть созданы, например, путем создания мотива Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, где Xaa не является пролином. Создание этой консенсусной последовательности путем аминокислотной модификации может включать, например, единственную аминокислотную замену нативного аминокислотного остатка на аспарагин, единственную аминокислотную замену нативного аминокислотного остатка на серин, треонин или цистеин или двойную аминокислотную замену, включающую первую аминокислотную замену нативного остатка на аспарагин и вторую аминокислотную замену нативного остатка на серин, треонин или цистеин, или вставку не нативного мотива N-гликозилирования, такого как мотив Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, где Xaa не является пролином.

Использованный в настоящем документе термин “уровень гликозилирования” относится к числу сайтов гликозилирования, доступных для присоединения к ним гликана, например, при экспрессии в клетке-хозяине, способной осуществлять гликозилирование.

Использованный в настоящем документе термин увеличение со ссылкой на уровень гликозилирования означает, что существует больше сайтов гликозилирования, доступных для присоединения к ним гликана, по сравнению с немодифицированным ADA2 или ADA2 дикого типа. Вариант ADA2, имеющий увеличенный уровень гликозилирования может быть гипергликозилированным, если число сайтов гликозилирования, к которым присоединен гликан, выше, чем число таких сайтов гликозилирования у немодифицированного ADA2 или ADA2 дикого типа.

Использованный в настоящем документе термин “стабильность белка” относится к свойству поддержания одного или нескольких физических свойств белка в ответ на условие окружающей среды (*например,* повышенная температура). В одном из вариантов воплощения, физическое свойство представляет собой поддержание ковалентной структуры белка (*например,* отсутствие протеолитического расщепления, нежелательного окисления или

дезамидирования). В другом варианте воплощения, физическое свойство представляет собой сохранение правильно фолдированной структуры белка (*например,* отсутствие растворимых и нерастворимых агрегатов или преципитатов). В одном из вариантов воплощения, стабильность белка измеряют путем оценки биофизического свойства белка, например, термостабильности, профиля разворачивания в зависимости от pH, стабильное снятие гликозилирования, растворимости, биохимической функции (*например,* способность связываться с белком, таким как рецептор, или ферментативная активность) и/или их комбинации. В другом варианте воплощения, биохимическую функцию демонстрируют по аффинности связывания. Стабильность может быть измерена с использованием способов, известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе.

Использованный в настоящем документе термин "время полужизни" относится ко времени, которое требуется живым существам для элиминации (выведения) половины количества введенного вещества естественными путями. Естественные (нормальные) пути элиминации обычно включают почки и печень, но могут включать другие пути экскреции. Время полужизни может быть описано как время, которое требуется для уменьшения концентрации вещества в два раза по сравнению с устойчивым состоянием или конкретной точкой на кривой элиминации. Время полужизни, как правило, измеряется в плазме и может быть определено путем измерения концентрации лекарственного средства в плазме в разные временные точки после введения однократной дозы лекарственного средства для установления отношения между временем и уменьшением концентрации элиминируемого вещества.

Использованный в настоящем документе термин "увеличенное время полужизни" относится к более продолжительному времени жизни молекулы белка по сравнению с белком сравнения. Следовательно, это означает, что уменьшение концентрации вещества в два раза происходит за более продолжительное время по сравнению с белком сравнения. Время полужизни может быть увеличено, по меньшей мере, на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%,

1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000%, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% или больше по сравнению со временем полужизни немодифицированного полипептида. Анализы для оценки времени полужизни хорошо известны и являются стандартными в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин "термостабильность" относится к показателю устойчивости белка к денатурации, которая происходит при воздействии высоких или повышенных температур, и, таким образом, относится к способности белка функционировать при конкретной температуре. Полипептид является термически стабильным при температуре, если он сохраняет при этой температуре, по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше от активности или свойства полипептида. Термостабильность может быть измерена либо известными методиками, либо способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения, термостабильность оценивают, измеряя температуру плавления (Tm) белка или с помощью анализа термического воздействия (Tc).

Использованный в настоящем документе термин "увеличенная термостабильность" относится к более высокой степени устойчивости белка к денатурации. Например, это может означать, что белок является термически стабильным при более высокой температуре по сравнению с белками сравнения. Это также может означать, что белок сохраняет больше активности при конкретной температуре по сравнению с активностью белка сравнения при той же температуре. В некоторых случаях, увеличенная термостабильность означает, что белок имеет более высокую температуру плавления Tm по сравнению с белком сравнения. Например, термостабильность увеличена, если Tm белка, по меньшей мере, на 0,1°C, 0,2°C, 0,3°C, 0,4°C, 0,5°C, 0,6°C, 0,7°C, 0,8°C, 0,9°C, 1,0°C, 1,5°C, 2,0°C, 2,5°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C или больше, выше, чем температура плавления немодифицированного белка.

Использованный в настоящем документе термин температура плавления (Tm; также называемый температура перехода) представляет собой температуру в середине кривой температурного перехода, при которой 50% молекул композиции находятся в фолдированном состоянии. Следовательно, это температура, при которой денатурирует 50% макромолекулы, и она является

стандартным параметром для описания термостабильности белка. Способы определения Tm хорошо известны специалисту в данной области техники и включают, например, методы аналитической спектроскопии, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), спектроскопия кругового дихроизма (CD)), спектроскопия флуоресцентной эмиссии или спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин "оптимум pH" относится к pH, при котором любая ферментативная реакция, такая как активность аденозиндезаминазы, протекает наиболее эффективно при заданных условиях. В отношении активности аденозиндезаминазы, оптимум pH для ADA2 составляет или составляет примерно 65.

Использованный в настоящем документе термин "измененный оптимум pH" относится к изменению (увеличению или уменьшению) pH, который является оптимальным pH для активности аденозиндезаминазы. Оптимум pH считается увеличенным, если оптимум pH выше на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,0, 2,5 или больше, чем оптимум pH белка сравнения или немодифицированного белка. Оптимум pH считается уменьшенным, если оптимум pH меньше на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,0, 2,5 или больше, чем оптимум pH белка сравнения или немодифицированного белка.

Использованный в настоящем документе термин “связанный”, “связывание” или его грамматические варианты относится к участию молекулы в любом взаимодействии с другом молекулой, в результате которого возникает стабильная ассоциация, в которой две молекулы находятся в непосредственной близости друг к другу. Связывание включает нековалентные связи, ковалентные связи (такие как обратимые и необратимые ковалентные связи), но не ограничиваясь этим, и включает взаимодействие между молекулами, такими как белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и низкомолекулярные соединения, такие как химические соединения, в том числе лекарственные средства, но не ограничиваясь. Как правило, связывание включает ассоциацию двух или более молекул за счет одной или нескольких нековалентных связей.

Связывание можно оценить стандартными способами, известными в данной области техники, в том числе, с помощью равновесного диализа, радиоиммунологических анализов радиоактивно меченого целевого антигена, иммунологических анализов (*например,* твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), изотермической титрационной калориметрии (ITC) и других способов, хорошо известных специалисту в данной области техники, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин активность связывания относится к характеристикам молекулы, например, полипептида, относящимся к тому, связывается или нет, и как, молекула с одним или несколькими партнерами по связыванию. Активности связывания включают способность связываться с партнером по связыванию (с партнерами по связыванию), аффинность с которой молекула связывается со своим партнером по связыванию (например, высокая аффинность), авидность, с которой молекула связывается со своим партнером по связыванию, сила связи с партнером по связыванию и/или специфичность связывания с партнером по связыванию.

Использованный в настоящем документе термин "связывание с гепарином" относится к способности ADA2 связываться с гепарином, который представляет собой сильно сульфатированный гликозаминогликан, состоящий из по-разному сульфатированных повторяющихся дисахаридных единиц. Обычно, дисахаридные единицы гепарина состоят из 2-O-сульфатированной идуроновой кислоты и 6-O-сульфатированного, N-сульфатированного глюкозамина, IdoA(2S)-GlcNS(6S).

Использованный в настоящем документе термин "пониженное связывание с гепарином" или "ослабленное связывание с гепарином" относится к уменьшенной или сниженной активности связывания с гепарином. Например, это может означать, что уровень или степень связывания белка ADA2, такого как вариант ADA2, меньше, чем у белка сравнения. Например, связывание с гепарином снижено, если уровень или степень связывания белка ADA2 с гепарином не превышает 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от связывания белка сравнения ADA2 или немодифицированного белка

ADA2 с гепарином. В некоторых случаях связывание с гепарином снижено, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 0,5 раз, 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или больше по сравнению со связыванием с гепарином белка сравнения ADA2 или немодифицированного белка ADA2.

Использованный в настоящем документе термин "аденозиновый рецептор" или ADR относится к классу рецепторов, связанных с G-белками, с которыми связывается аденозин. Аденозиновые рецепторы также могут связываться с ADA2. Существует четыре типа аденозиновых рецепторов. Например, у человека ADR обозначаются A_1 (SEQ ID NO: 533), A_{2A} (SEQ ID NO: 534), A_{2B} (SEQ ID NO: 535) и A_3 (SEQ ID NO: 536-538).

Использованный в настоящем документе термин "связывание с рцептором" относится к способности ADA2 связываться с аденозиновым рецептором.

Использованный в настоящем документе термин "пониженное связывание с рецептором" относится к уменьшенной или сниженной активности связыванию с аденозиновым рецептором. Например, это может означать, что уровень или степень связывания белка ADA2, такого как вариант ADA2, меньше, чем связывание белка сравнения с тем же самым аденозиновым рецептором. Например, связывание с рецептором снижено, если уровень или степень связывания белка ADA2 с аденозиновым рецептором не превышает 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от связывания белка сравнения ADA2 или немодифицированного белка ADA2 с тем же самым аденозиновым рецептором. В некоторых случаях связывание с рецептором снижено, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 0,5 раз, 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или больше по сравнению со связыванием с тем же самым аденозиновым рецептором белка сравнения ADA2 или немодифицированного белка ADA2.

Использованная в настоящем документе фраза, что белки “сравниваются в одни и тех же условиях” означает, что разные белки обрабатываются идентичным или по существу идентичным образом, в результате чего любое

одно или несколько условий, которые могут влиять на активность или свойства белка или агента, остаются неизменными или по существу неизменными для тестируемых агентов. Например, когда активность аденозиндезаминазы ADA2 сравнивают с немодифицированным белком ADA2, любое одно или несколько условий, такие как количество или концентрация белка; наличие, в том числе количество, эксципиентов, носителей или других компонентов в лекарственной форме, отличных от активного агента; температура; pH и/или другие условия являются идентичными или по существу идентичными между сравниваемыми полипептидами.

Использованный в настоящем документе термин "иммунные контрольные точки" относится к ингибирующим путям иммунной системы, ответственных за поддержание аутотолерантности и модулирование продолжительности и амплитуды физиологического иммунного ответа в периферических тканях, чтобы минимизировать побочное повреждение тканей. Иммунные контрольные точки регулируются белками иммунных контрольных точек.

"Белок иммунной контрольной точки" представляет собой белок, как правило, рецептор (*например,* CTLA4 или PD-1) или лиганд (*например,*, PD-L1), который регулирует или модулирует степень иммунного ответа. Белки иммунных контрольных точек могут быть ингибирующими или стимулирующими. В частности, белки иммунных контрольных точек ингибируют активацию иммунного ответа. Таким образом, ингибирование белка иммунных контрольных точек стимулирует или активирует иммунный ответ, например, активирует Т-клетки и их пролиферацию.

Использованный в настоящем документе термин "ингибитор иммунных контрольных точек" или "ингибирующий агент иммунных контрольных точек" или "блокирующий агент иммунных контрольных точек" относится к агенту, который связывается с ингибирующим белком иммунных контрольных точек и блокирует его активность. Ингибирование может представлять собой конкурентное или не конкурентное ингибирование, которое может быть стерическим или аллостерическим. Если белок иммунных контрольных точек является иммуностимулирующим белком, ингибитор иммунных контрольных

точек способствует активации иммуностимулирующего белка, например, за счет связывания или активации стимулирующего белка иммунных контрольных точек или ингибирования за счет взаимодействия, такого как связывание или деактивация, с ингибиторами стимулирующего белка иммунных контрольных точек. Примером ингибитора иммунных контрольных точек является антитело против белка иммунных контрольных точек.

"Мишенью" ингибитора иммунных контрольных точек является белок иммунных контрольных точек, с которым ингибитор иммунных контрольных точек или ингибирующий агент иммунных контрольных точек связывается и блокирует его активность. Как правило, ингибитор иммунных контрольных точек специфично связывается с мишенью. Например, мишенью приведенного в качестве примера антитела против CTLA4, называемого ипилимумаб, является CTLA4.

Использованный в настоящем документе термин антитело против белка иммунных контрольных точек, относится к любому антителу, которое специфично связывается с белком иммунных контрольных точек или его растворимым фрагментом и блокирует. Антитело против белка иммунных контрольных точек, как правило, связывается с белковым лигандом иммунных контрольных точек или с белковым рецептором иммунных контрольных точек и блокирует связывание рецептора с целевым белковым лигандом иммунных контрольных точек или лигандом целевого белкового рецептора иммунных контрольных точек, тем самым предотвращая передачу ингибирующего сигнала, который супрессирует иммунный ответ. Следовательно, антитела против белков иммунных контрольных точек являются ингибиторами иммунных контрольных точек. Ссылка на антитела против белка иммунных контрольных точек в настоящем документе включает полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с белковым лигандом или рецептором иммунных контрольных точек. Примеры антител против белков иммунных контрольных точек включают антитела против белка, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4) и антитела против белка запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1).

Использованный в настоящем документе термин антигенсвязывающий фрагмент антитела против белка иммунных контрольных точек относится к антителу, полученному из антитела против белка иммунных контрольных точек, но не содержащим полноразмерную последовательность антитела против белка иммунных контрольных точек, но содержащим, по меньшей мере, часть вариабельных областей (тяжелой и легкой) антитела, достаточную для образования антигенсвязывающего сайта (*например,* одного или нескольких CDR, и, как правило, всех CDR) и, следовательно, сохраняющего специфичность и/или активность связывания антитела против белка иммунной контрольной точки.

Использованный в настоящем документе термин антитело против CTLA4 относится к любому антителу, которое специфично связывается с белком, ассоциированным с цитотоксическими Т-лимфоцитами 4 (CTLA4) или его растворимым фрагментом и блокирует связывание лигандов с CTLA4, что приводит к конкурентному ингибированию CTLA4 и ингибированию опосредованного CTLA4 ингибирования активности Т-клеток. Следовательно, антитела против CTLA4 являются ингибиторами CTLA4. Ссылка на антитела против CTLA4 в настоящем документе включает полноразмерное антитело и его производные, такие как его антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с CTLA4. . Примеры антител против CTLA4 включают ипилимумаб или тремелимумаб или их производное, или антигенсвязывающий фрагмент, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин антитело против PD-1 относится к любому антителу, которое специфично связывается с белком запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) или его растворимым фрагментом и блокирует связывание лигандов с PD-1, что приводит к конкурентному ингибированию PD-1 и ингибированию опосредованного PD-1 ингибирования активности Т-клеток. Следовательно, антитела против PD-L1 являются ингибиторами PD-1. Следовательно, антитела против PD-1 являются ингибиторами PD-1. Ссылка на антитела против PD-1 в настоящем документе включает полноразмерное антитело и его производные, такие как его антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с PD-1.

Примеры антител против PD-1 включают ниволумаб, MK-3475, пидилизумаб или их производное, или антигенсвязывающий фрагмент, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин антитело против PD-L1 относится к антителу, которое специфично связывается с лигандом белка запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1) или его растворимым фрагментом и блокирует связывание лиганда с PD-1, что приводит к конкурентному ингибированию PD-1 и ингибированию опосредованного PD-1 ингибирования активности Т-клеток. Следовательно, антитела против PD-L1 являются ингибиторами PD-1. Ссылка на антитела против PD-L1 в настоящем документе включает полноразмерное антитело и его производные, такие как его антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с PD-L1. Примеры антител против PD-L1 включают BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 или их производное, или антигенсвязывающий фрагмент, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин “антитело” относится к иммуноглобулинам и фрагментам иммуноглобулинов, которые могут встречаться в природе или частично или полностью быть синтетическими, например, полученные рекомбинантным путем, в том числе, к любому их фрагменту, содержащему, по меньшей мере, часть вариабельной тяжелой цепи и легкой области молекулы иммуноглобулина, достаточную для образования антигенсвязывающего сайта и, в собранном виде, для специфического связывания антигена. Таким образом, антитело включает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный или практически гомологичный иммуноглобулиновому антигенсвязывающему домену (активный центр антитела). Например, антитело относится к антителу, которое содержит две тяжелые цепи (которые могут быть обозначены H и H’) и две легкие цепи (которые могут быть обозначены L и L’), где каждая тяжелая цепь может представлять собой полноразмерную тяжелую цепь иммуноглобулина или ее часть, достаточную для образования антигенсвязывающего сайта (*например*, тяжелые цепи включают VH цепи, VH-CH1 цепи и VH-CH1-CH2-CH3 цепи, но не ограничиваясь этим), и каждая легкая цепь может представлять собой

полноразмерную легкую цепь иммуноглобулина или ее часть, достаточную для образования антигенсвязывающего сайта (*например,* легкие цепи включают VL цепи и VL-CL цепи, но не ограничиваясь этим). Каждая тяжелая цепь (H и H') образует пару с одной легкой цепью (L и L', соответственно). Как правило, минимально антитела включают всю или, по меньшей мере, часть вариабельной тяжелой (VH) цепи и/или вариабельной легкой (VL) цепи. Антитело также может включать всю или часть константной области.

Для целей настоящего документа, термин антитело включает полноразмерные антитела и их части, в том числе, фрагменты антител. Фрагменты антител включают Fab фрагменты, Fab' фрагменты, $F(ab')_2$ фрагменты, Fv фрагменты, дисульфидно-связанные Fv (dsFv), Fd фрагменты, Fd' фрагменты, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные Fab (scFab), диатела, антиидиотипические (анти-Id) антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных, но не ограничиваясь этим. Антитело также включает синтетические антитела, антитела, полученные рекомбинантным путем, мультиспецифические антитела (*например,* биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и интраантитела. Антитела, предусмотренные в настоящем документе, включают представителей любого типа (*например*, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY) и класса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса (*например*, IgG2a и IgG2b) иммуноглобулинов.

Использованная в настоящем документе фраза "полученный из" по отношению к фрагментам антитела, полученным из другого антитела, такого как, моноклональное антитело, относится к конструированию фрагментов антител (*например,* Fab, F(ab'), $F(ab')_2$, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, dsFv, диатело, Fd и Fd' фрагменты), которые сохраняют специфичность связывания исходного антитела. Такие фрагменты могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе ферментативным расщеплением, химическим перекрестным сшиванием, рекомбинантными способами или их комбинацией, но не ограничиваясь этим. Обычно, полученный фрагмент антитела имеет идентичную или практически идентичную вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область

легкой цепи (V_L) исходного антитела, так что фрагмент антитела и исходное антитело связывают одинаковый эпитоп.

Использованный в настоящем документе термин антигиалуронановый агент относится к любому агенту, который модулирует синтез или деградацию гиалуронана (HA), тем самым изменяя уровень гиалуронана в ткани или клетке. Для целей настоящего документа, антигиалуронановые агенты снижают уровни гиалуронана в ткани или клетке по сравнению с уровни гиалуронана в ткани или клетке в отсутствии агента. Такие агенты включают соединения, которые модулируют экспрессию генетического материала, кодирующего синтазу HA (HAS) и другие ферменты или рецепторы, участвующие в метаболизме гиалуронана, или которые модулируют белки, синтезирующие или деградирующие гиалуронан, в том числе функцию или активность HAS. Агенты включают низкомолекулярные соединения, нуклеиновые кислоты, пептиды, белки или другие соединения. Например, антигиалуронановые агенты включают антисмысловые или смысловые молекулы, антитела, ферменты, низкомолекулярные ингибиторы и аналоги субстратов HAS, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин деградирующий гиалуронан фермент относится к ферменту, который катализирует расщепление полимера гиалуронана (также называемого гиалуроновой кислоты или HA) на фрагменты с меньшей молекулярной массой. Примерами деградирующих гиалуронан ферментов являются гиалуронидазы и конкретно хондроитиназы и лиазы, которые обладают способностью к деполимеризации гиалуронана. Примеры хондроитиназ, которые являются деградирующими гиалуронан ферментами, включают хондроитин-ABC-лиазу (также известную как хондроитиназа ABC), хондроитин-AC-лиазу (также известную как хондроитинсульфатлиаза или хондроитинсульфатэлиминаза) и хондроитин-C-лиазу, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин гиалуронидаза относится к классу деградирующих гиалуронан ферментов. Гиалуронидазы включают бактериальные гиалуронидазы (EC 4.2.2.1 or EC 4.2.99.1), гиалуронидазы из пиявок, других паразитов и ракообразных (EC 3.2.1.36) и

гиалуронидазы млекопитающих (EC 3.2.1.35). Гиалуронидазы включают любую из гиалуронидаз не человеческого происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, мышиную, собачью, кошачью, заячью, птичью, бычью, овечью, свиную, лошадиную, рыбную, лягушачью гиалуронидазу, бактериальные гиалуронидазы, и любые гиалуронидазы из пиявок, других паразитов и ракообразных. Например, гиалуронидазы включают гиалуронидазы человеческого происхождения. Примеры человеческих гиалуронидаз включают HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 и PH20 (SEQ ID NO:480 и 551). Также гиалуронидазы включают растворимые гиалуронидазы, в том числе овечью и бычью PH20, растворимую человеческую PH20 и растворимую rHuPH20. Примерами коммерчески доступных бычьих или овечьих растворимых гиалуронидаз являются Vitrase® (овечья гиалуронидаза), Amphadase® (бычья гиалуронидаза) и Hydase™ (бычья гиалуронидаза).

Ссылка на деградирующие гиалуронан ферменты или гиалуронидазы включает полипептиды-предшественники деградирующих гиалуронан ферментов и зрелые деградирующие гиалуронан ферменты (например, такие, в которых была удалена сигнальная последовательность), их укороченные форме, которые обладают активностью, и включает аллельные варианты и межвидовые варианты, варианты, кодируемые сплайс-вариантами, и другие варианты, в том числе полипептиды, которые имеют, по меньшей мере, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с полипептидами-предшественниками, или их зрелые формы. Деградирующие гиалуронан ферменты и гиалуронидазы также включают те, которые содержат химические или посттрансляционные модификации, и те, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, фосфорилирование и другие модификации полипептида, известные в данной области. Укороченная гиалуронидаза PH20 представляет собой любую ее форму, укороченную с С-конца, в частности формы, укороченные и активные в нейтральной среде, если они являются N-гликозилированными.

Использованный в настоящем документе термин “бычья PH20” относится к а бычьей гиалуронидазе, очищенной из бычьих тестикулярных экстрактов (см. патенты США номер 2,488,564, 2,488,565, 2,806,815, 2,808,362, 2,676,139, 2,795,529, 5,747,027 и 5,827,721). Примеры коммерчески доступных очищенных бычьих тестикулярных гиалуронидаз включают Amphadase® и Hydase™ и бычьи гиалуронидазы, в том числе те, которые доступны из Sigma Aldrich, Abnova, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Raybiotech, Inc., и Calzyme, но не ограничиваясь этим. Также включены бычьи гиалуронидазы, полученные рекомбинантным путем.

Использованный в настоящем документе термин “овечья PH20” относится к овечьей гиалуронидазе, очищенной из овечьих тестикулярных экстрактов (см. патенты США номер 2,488,564, 2,488,565 и 2,806,815 и международную опубликованную заявку PCT номер WO2005/118799). Примеры коммерчески доступных очищенных из овечьего тестикулярного экстракта гиалуронидаз включают Vitrase® и овечьи гиалуронидазы, в том числе те, которые доступны из Sigma Aldrich, Cell Sciences, EMD Chemicals, GenWay Biotech, Inc., Mybiosource.com и Raybiotech, Inc, но не ограничиваясь этим. Также включены овечьии гиалуронидазы, полученные рекомбинантным путем.

Использованный в настоящем документе термин “PH20” относится к типу гиалуронидаз, которые встречаются в сперме и являются активными в нейтральной среде. PH-20 встречаются поверхности сперматозоидов и в происходящей из лизосомы акросоме, где связаны с внутренней мембраной акросомы. PH20 включает PH20 любого происхождения, в том числе PH20 человека, шимпанзе, макака-крабоеда, макака-резуса, мыши, быка, овцы, морской свинки, кролика и крысы, но не ограничиваясь этим. Примеры полипептидов PH20 включают полипептиды PH20 из человека (белок-предшественник приведен в SEQ ID NO: 551 и зрелая форма приведена в SEQ ID NO:480).

Использованный в настоящем документе термин “растворимая PH20” относится к любой форме PH20, которая при физиологических условиях является растворимой. Растворимые PH20 можно идентифицировать, например, по распределению в водной фазе раствора Triton® X-114, нагретого до 37 °C

(Bordier *et al.*, (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1604-7). Заякоренные в мембране PH20, такие как PH20 с липидным якорем, в том числе PH20 с GPI якорем, будут распределяться в богатой детергентами фазе, но после обработки фосфолипазой С будут распределяться в бедной детергентами или водной фазе. К числу растворимых PH20 относятся заякоренные в мембране PH20, в которых одна или несколько областей, связывающих PH20 с мембраной, были удалены или изменены, и при этом растворимая форма гиалуронидазы сохраняет активность. Растворимые PH20 также включают рекомбинантные растворимые PH20 и те, которые содержатся в природных источниках или очищены из них, например, экстрактах из семенников овец или коров. Примером таких растворимых PH20 является растворимая человеческая PH20. Примерами растворимых человеческих полипептидов PH20 являются полипептиды, приведенные в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, или имеющие последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, и которые являются растворимыми и сохраняют активность гиалуронидазы.

Использованный в настоящем документе термин “растворимая рекомбинантная человеческая PH20 (rHuPH20)” относится к композиции, содержащей растворимую форму человеческой PH20, которая рекомбинантно экспрессируется и секретируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Растворимая rHuPH20 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которая включает сигнальную последовательность и кодирует полипептид, приведенный в SEQ ID NO:481. Нуклеиновая кислота, кодирующая растворимый rHuPH20, экспрессируется в клетках CHO, которые секретируют зрелый полипептид. При получении в культуральной среде, существует гетерогенность на С-конце, так что продукт включает смесь полипептидов, которые включают любой один или более из SEQ ID NO:481-486 с различной представленностью.

Использованный в настоящем документе термин “активность гиалуронидазы” относится к способности ферментативным путем катализировать расщепление гиалуроновой кислоты. В анализе Фармакопеи

США (USP) XXII активность гиалуронидазы определяют не напрямую путем измерения количества субстрата гиалуроновой кислоты более высокой молекулярной массы, или гиалуронана, (HA), оставшегося после реакции фермента с HA в течение 30 мин при 37°C (USP XXII-NF XVII (1990) 644-645 United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD). При анализе может быть использован стандартный раствор сравнения, чтобы установить относительную активность в единицах для любой гиалуронидазы. *In vitro* анализы для определения гиалуронидазной активности гиалуронидаз, таких как PH20, в том числе растворимая PH20 и esPH20, известны в данной области и описаны в настоящем документе. Примеры анализов включают микротурбидиметрический анализ, который измеряет расщепление гиалуроновой кислоты гиалуронидазой не напрямую путем обнаружения нерастворимого осадка, образующегося при связывании нерасщепленной гиалуроновой кислоты с сывороточным альбумином, и анализ с биотинилированной гиалуроновой кислотой, который измеряет расщепление гиалуроновой кислоты не напрмяую путем обнаружения оставшейся биотинилированной гиалуроновой кислоты, не ковалентно связанной с лунками микротитрационного планшета, с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена и хромогенного субстрата. Стандартные образцы могут быть использованы, например, для получения стандартной кривой для определения активности в единицах для тестируемой гиалуронидазы.

Использованный в настоящем документе термин “активный в нейтральной среде” относится к способности полипептида PH20 ферментативным путем катализировать расщепление гиалуроновой кислоты при нейтральном pH (*например,* при или примерно при pH 7,0).

Использованный в настоящем документе термин противораковый агент или химиотерапевтический агент относится к агенту, который способен убивать быстро делящиеся клетки, такие как раковые клетки. Специалисту в данной области техники известны противораковые агенты, в том числе химиотерапевтические агенты. Примеры агентов описаны в настоящем документе.

Использованный в настоящем документе термин “биологическая активность” относится к *in vivo* активности соединения или физиологическому ответу, развивающемуся после *in vivo* введения соединения, композиции или другой смеси. Биологическая активность, таким образом, включает терапевтические эффекты и фармацевтическую активность таких соединений, композиций и смесей. Биологическую активность можно наблюдать в *in vitro* системах, предназначенных для тестирования или применения такой активности. Таким образом, для целей настоящего документа биологическая активность ADA2 включает активность аденозиндезаминазы.

Использованный в настоящем документе термин “оценка” и его грамматические варианты включает количественное и качественное определение в смысле получения абсолютного значения активности полипептида, и также получения индекса, отношения, процента, визуального или другого значения, свидетельствующего об уровне активности. Оценивать можно напрямую или не напрямую. Например, обнаружение расщепления субстрата полипептидом может заключаться в прямом измерении продукта, или может представлять собой непрямое измерение путем определения итоговой активности расщепленного субстрата.

Использованный в настоящем документе термин “нумерация зрелой формы” или “стандартная нумерация” относится к нумерации остатков в том порядке, в котором они находятся в зрелом полипептиде ADA2. Для целей настоящего документа нумерация зрелой формы основана на нумерации остатков зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5.

Использованный в настоящем документе термин "нумерация по Zavialov" относится к нумерации остатков, использованной в Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377 и номера доступа в PDB 3LGG и 3LGD. Нумерация по Zavialov основана на нумерации остатков ADA2, приведенных в SEQ ID NO:4. Следовательно, нумерация по Zavialov может быть определена путем выравнивания с SEQ ID NO:4. В таблице 1 ниже приведено соответствие номеров положений между зрелой нумерацией и нумерацией по Zavialov. В таблице 1 предусмотрена последовательность аминокислот, приведенная в SEQ ID NO:4 (последовательность сравнения для нумерации по Zavialov), номера

положений в ней и соответствующие номера положений для SEQ ID NO: 5 (последовательность сравнения для нумерации зрелой формы, используемой в настоящем документе).

Таблица 1. Соответствующие номера положений для нумерации зрелой формы (SEQ ID NO: 5) и нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4)

SEQ ID NO: 5 (зрелая)				1	2	3	4	5	6	7
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Последовательность (SEQ ID NO:4)	G	G	S	I	D	E	T	R	A	H
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Последовательность (SEQ ID NO:4)	L	L	L	K	E	K	M	M	R	L
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Последовательность (SEQ ID NO:4)	G	G	R	L	V	L	N	T	K	E
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	L	A	N	E	R	L	M	T	L
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Последовательность (SEQ ID NO:4)	K	I	A	E	M	K	E	A	M	R
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Последовательность (SEQ ID NO:4)	T	L	I	F	P	P	S	M	H	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Последовательность (SEQ ID NO:4)	F	Q	A	K	H	L	I	E	R	S
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Последовательность (SEQ ID NO:4)	Q	V	F	N	I	L	R	M	M	P
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Последовательность (SEQ ID NO:4)	K	G	A	A	L	H	L	H	D	I
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Последовательность (SEQ ID NO:4)	G	I	V	T	M	D	W	L	V	R
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Последовательность (SEQ ID NO:4)	N	V	T	Y	R	P	H	C	H	I
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Последовательность (SEQ ID NO:4)	C	F	T	P	R	G	I	M	Q	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Последовательность (SEQ ID NO:4)	R	F	A	H	P	T	P	R	P	S
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137

Таблица 1. Соответствующие номера положений для нумерации зрелой формы (SEQ ID NO: 5) и нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4)

SEQ ID NO:4 (Zavialov)	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	K	C	S	K	W	I	L	L	E
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Последовательность (SEQ ID NO:4)	D	Y	R	K	R	V	Q	N	V	T
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	F	D	D	S	L	L	R	N	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
Последовательность (SEQ ID NO:4)	T	L	V	T	Q	H	P	E	V	I
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Последовательность (SEQ ID NO:4)	Y	T	N	Q	N	V	V	W	S	K
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
Последовательность (SEQ ID NO:4)	F	E	T	I	F	F	T	I	S	G
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Последовательность (SEQ ID NO:4)	L	I	H	Y	A	P	V	F	R	D
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Последовательность (SEQ ID NO:4)	Y	V	F	R	S	M	Q	E	F	Y
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	D	N	V	L	Y	M	E	I	R
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
Последовательность (SEQ ID NO:4)	A	R	L	L	P	V	Y	E	L	S
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Последовательность (SEQ ID NO:4)	G	E	H	H	D	E	E	W	S	V
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
Последовательность (SEQ ID NO:4)	K	T	Y	Q	E	V	A	Q	K	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Последовательность (SEQ ID NO:4)	V	E	T	H	P	E	F	I	G	I
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
Последовательность (SEQ ID NO:4)	K	I	I	Y	S	D	H	R	S	K
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
Последовательность (SEQ ID NO:4)	D	V	A	V	I	A	E	S	I	R

Таблица 1. Соответствующие номера положений для нумерации зрелой формы (SEQ ID NO: 5) и нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4)										
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
Последовательность (SEQ ID NO:4)	M	A	M	G	L	R	I	K	F	P
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
Последовательность (SEQ ID NO:4)	T	V	V	A	G	F	D	L	V	G
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
Последовательность (SEQ ID NO:4)	H	E	D	T	G	H	S	L	H	D
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
Последовательность (SEQ ID NO:4)	Y	K	E	A	L	M	I	P	A	K
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
Последовательность (SEQ ID NO:4)	D	G	V	K	L	P	Y	F	F	H
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
Последовательность (SEQ ID NO:4)	A	G	E	T	D	W	Q	G	T	S
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
Последовательность (SEQ ID NO:4)	I	D	R	N	I	L	D	A	L	M
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
Последовательность (SEQ ID NO:4)	L	N	T	T	R	I	G	H	G	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
Последовательность (SEQ ID NO:4)	A	L	S	K	H	P	A	V	R	T
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
Последовательность (SEQ ID NO:4)	Y	S	W	K	K	D	I	P	I	E
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
Последовательность (SEQ ID NO:4)	V	C	P	I	S	N	Q	V	L	K
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
Последовательность (SEQ ID NO:4)	L	V	S	D	L	R	N	H	P	V
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
Последовательность (SEQ ID NO:4)	A	T	L	M	A	T	G	H	P	M
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
Последовательность (SEQ ID NO:4)	V	I	S	S	D	D	P	A	M	F
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430

Таблица 1. Соответствующие номера положений для нумерации зрелой формы (SEQ ID NO: 5) и нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4)										
Последовательность (SEQ ID NO:4)	G	A	K	G	L	S	Y	D	F	Y
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	V	F	M	G	I	G	G	M	K
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
Последовательность (SEQ ID NO:4)	A	D	L	R	T	L	K	Q	L	A
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
Последовательность (SEQ ID NO:4)	M	N	S	I	K	Y	S	T	L	L
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
Последовательность (SEQ ID NO:4)	E	S	E	K	N	T	F	M	E	I
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
Последовательность (SEQ ID NO:4)	W	K	K	R	W	D	K	F	I	A
SEQ ID NO: 5 (зрелая)	478	479	480	481	482					
SEQ ID NO:4 (Zavialov)	481	482	483	484	485					
Последовательность (SEQ ID NO:4)	D	V	A	T	K					

Использованный в настоящем документе термин “конъюгат” относится к полипептиду, присоединенному напрямую или не напрямую к одному или нескольким другим полипептидам или химическим фрагментам. Такие конъюгаты включают белки слияния, конъюгаты, полученные химическим конъюгированием, и конъюгаты, полученные любыми другими способами. Например, конъюгат относится к белку ADA2, связанному напрямую или не напрямую с одним или несколькими другими полипептидами или химическими фрагментами, при этом, по меньшей мере, одна субъединица полипептида ADA2 связана напрямую или не напрямую с другим полипептидом или химическим фрагментом при условии, что конъюгат сохраняет активность аденозиндезаминазы.

Использованный в настоящем документе термин “связанный” или “конъюгированный” означает присоединенный посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия.

Использованный в настоящем документе термин химерный полипептид относится к полипептиду, который содержит части, по меньшей мере, из двух разных полипептидов или две несмежные части одного полипептида. Таким

образом, химерный полипептид обычно включает последовательность аминокислотных остатков из всей или части последовательности одного полипептида и последовательность аминокислотных остатков из всей или части последовательности другого полипептида. Две части могут быть связаны напрямую или не напрямую и могут быть связаны посредством пептидных связей, других ковалентных связей, ковалентных взаимодействий достаточной силы для поддержания целостности части химерного полипептида в равновесных условиях и физиологических условиях, таких как, изотонический буферный солевой раствор с pH 7.

Использованный в настоящем документе термин белок слияния представляет собой полипептид, сконструированный таким образом, чтобы содержать последовательности аминокислот, соответствующие двум отдельным полипептидам, которые соединены вместе, например, путем экспрессии белка слияния из вектора, содержащего две нуклеиновые кислоты, кодирующие два близкорасположенных друг к другу полипептида, *например*, расположенные рядом друг с другом по длине вектра. Соответственно, белок слияния относится к химерному белку, содержащему два, или части от двух, или более белков или пептидов, которые связаны напрямую или не напрямую посредством пептидных связей. Две молекулы могут располагаться рядом в конструкции или могут быть разделены линкером, или спейсерным полипептидом.

Использованный в настоящем документе термин “линкерный” или “спейсерный” пептид относится к коротким последовательностям аминокислот, которые соединяют две полипептидные последовательности (или нуклеиновая кислота, кодирующая такую аминокислотную последовательность). “Пептидный линкер” относится к короткой последовательности аминокислот, соединяющей две полипептидные последовательности. Примерами полипептидных линкеров являются линкеры, соединяющие домен пептидной трансдукции с антителом, или линкеры, соединяющие две цепи антител в синтетическом фрагменте антитела, таком как, scFv фрагмент. Линкеры хорошо известны, и любые известные линкеры можно использовать в предусмотренных способах. Примерами полипептидных линкеров являются $(Gly\text{-}Ser)_n$ аминокислотные последовательности, с несколькими остатками Glu или Lys,

распределенными по всей последовательности для повышения растворимости. Другие примеры линкеров описаны в настоящем документе; любые из этих и других известных линкеров могут быть использованы с предусмотренными композициями и способами.

Использованный в настоящем документе термин домен мультимеризации относится к последовательности аминокислот, которая способствует стабильному взаимодействию молекулы полипептида с одной или несколькими дополнительными полипептидными молекулами, каждая из которых содержит комплементарный домен мультимеризации, которые могут быть одинаковыми или разными доменами мультимеризации, с образованием стабильного мультимера с первым доменом. Обычно, полипептид соединен напрямую или не напрямую с доменом мультимеризации. Примеры доменов мультимеризации включают иммуноглобулиновые последовательности или их части, лейциновые застежки, гидрофобные области, гидрофильные области и совместимые домены белок-белковых взаимодействий. Домен мультимеризации, например, может представлять собой иммуноглобулиновую константную область или домен, такой как, например, Fc домен из IgG или его часть, в том числе, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA, IgE, IgD и IgM и их модифицированные формы.

Использованный в настоящем документе термин "фрагмент" или "гетерологичный фрагмент" относится к молекуле, которая способна ассоциироваться с другой молекулой, либо напрямую, либо не напрямую за счет ковалентного или не ковалентного взаимодействия. Как правило, молекула имеет другую природу, нежели молекула, с которой она ассоциируется. В одном из вариантов воплощения, гетерологичный фрагмент может представлять собой полипептид, слитый с другим полипептидом с образованием полипептида или белка слияния. В другом варианте воплощения, гетерологичный фрагмент может быть не полипептидом, например, полимером, таким как PEG, конъюгированный с полипептидом или белком.

Использованный в настоящем документе термин "удлиняющий время полужизни фрагмент" представляет собой гетерологичный фрагмент, который увеличивает время полужизни молекулы, с которой он конъюгирован.

Использованный в настоящем документе термин “Fc” или “Fc область” или “Fc домен” относится к полипептиду, содержащему константную область тяжелой цепи антитела, за исключением первой константной области иммуноглобулинового домена. Таким образом, Fc относится к последним двум константным областям иммуноглобулиновых доменов IgA, IgD и IgE, или последним трем константным областям иммуноглобулиновых доменов IgE и IgM. Необязательно, Fc домен может включать всю или часть гибкой шарнирной последовательности, расположенной ближе к N-концу относительно Fc домена. В случае IgA и IgM, Fc может включать J цепь. Например, в случае Fc домена IgG, Fc содержит иммуноглобулиновые домены Cγ2 и Cγ3, и необязательно, всю или часть шарнирной последовательности между Cγ1 и Cγ2. Границы Fc области могут варьировать, но, как правило, включают, по меньшей мере, часть шарнирной области. Кроме того, Fc также включает любые аллельные или межвидовые варианты или любые варианты или модифицированные формы, например, любой вариант или модифицированную форму, которые изменяют связывание с FcR или изменяют Fc-опосредованную эффекторную функцию.

Использованный в настоящем документе термин “Fc химера” относится химерному полипептиду, в котором один или несколько полипептидов связаны, напрямую или не напрямую, с Fc областью или ее производным. Как правило, Fc химера объединяет Fc область иммуноглобулина с другим полипептидом. Производные или модифицированные Fc полипептиды хорошо известны специалистам в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин “полимер” относится к высокомолекулярному природному или синтетическому фрагменту, который конъюгирован, *т.е.,* стабильно связан напрямую или ненапрямую через линкер с полипептидом. Такие полимеры, как правило, увеличивают время полужизни в сыворотке и включают сиаловые фрагменты, пегилированные фрагменты, декстран и сахара и другие фрагменты, например, для гликозилирования, но не ограничиваясь этим. Например, белки ADA2, такие как вариант ADA2, могут быть конъюгированы с полимером.

Использованный в настоящем документе термин “пегилированный“ относится к ковалентному или другому стабильному присоединению

полимерных молекул, таких как полиэтиленгликоль (пегилирование фрагментом PEG), к белкам, в том числе к ADA2, например, к варианту ADA2. Пегилирование может увеличивать время полужизни ADA2.

Использованный в настоящем документе термин нуклеиновая кислота включает ДНК, РНК и их аналоги, в том числе пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и их смеси. Нуклеиновые кислоты могут быть одно- или двухцепочечными. При описании зондов или праймеров, которые необязательно могут быть мечеными, например, обнаруживаемой меткой, например, флуоресцентной или радиоактивной меткой, предусмотрены одноцепочечные молекулы. Такие молекулы, как правило, имеют такую длину, что их мишень является статистически уникальной или малокопийной (обычно менее 5, в целом менее 3) для зондирования или праймирования библиотеки. Обычно последовательность зонда или праймера содержит, по меньшей мере, 14, 16 или 30 непрерывных нуклеотидов, комплементарных или идентичных интересующему гену. Длина зондов и праймеров может составлять 10, 20, 30, 50, 100 или больше нуклеотидов.

Использованный в настоящем документе термин пептид относится к полипептиду, имеющему от 2 до 40 аминокислот в длину.

Использованные в настоящем документе аминокислоты, которые встречаются в различных аминокислотных последовательностях, предусмотренных в настоящем документе, идентифицируют в соответствии с их хорошо известными, трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурами (таблица 2). Нуклеотиды, которые встречаются в различных фрагментах нуклеиновых кислот, обозначаются стандартными однобуквенными обозначениями, широко используемыми в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин “аминокислота” представляет собой органическое соединение, которое содержит аминогруппу и карбоксильную группу. Полипептид содержит две или больше аминокислот. Для целей настоящего документа аминокислоты включают двадцать встречающихся в природе аминокислот, не встречающиеся в природе аминокислоты и аналоги аминокислот (т.е., аминокислоты, в которых α-углерод имеет боковую цепь).

В Таблице 2 приведены аббревиатуры для аминокислотных остатков в соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в *J. Biol. Chem.*, 243: 3557-3559 (1968) и принятой в 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822:

Таблица 2. Таблица соответствий		
ОБОЗНАЧЕНИЕ		
1-буквенное	**3-буквенное**	**АМИНОКИСЛОТА**
Y	Tyr	Тирозин
G	Gly	Глицин
F	Phe	Фенилаланин
M	Met	Метионин
A	Ala	Аланин
S	Ser	Серин
I	Ile	Изолейцин
L	Leu	Лейцин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутаминовая кислота
Z	Glx	Glu и/или Gln
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Asn и/или Asp
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестная или другая

Следует отметить, что все последовательности аминокислотных остатков, представленные в настоящем документе формулой, ориентированы слева направо традиционным образом в направлении от амино-конца к карбоксильному концу. Кроме того, фраза “аминокислотный остаток” включает аминокислоты, перечисленные в таблице соответствий (таблица 2) и модифицированные и необычные аминокислоты, такие как приведены в 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, и включенные в настоящий документ посредством ссылки. Более того, следует отметить, что черточка в начале или конце последовательности аминокислотных остатков указывает на пептидную связь со следующей последовательностью одного или нескольких аминокислотных

остатков, или на концевую амино-группу, такую как NH_2, или на концевую карбоксильную группу, такую как COOH.

Использованный в настоящем документе термин “гидрофобная аминокислота” включает любые аминокислоты, определенные как гидрофобные по принятой шкале гидрофобности Эйзенберга. Примерами являются встречающиеся в природе гидрофобные аминокислоты, такие как изолейцин, фенилаланин, валин, лейцин, триптофан, метионин, аланин, глицин, цистеин и тирозин (Eisenberg *et al.*, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109-120). Также включены не встречающиеся в природе гидрофобные аминокислоты.

Использованный в настоящем документе термин “кислая аминокислот” среди встречающихся в природе аминокислот включает остатки аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Также включены не встречающиеся в природе аминокислоты.

Использованный в настоящем документе термин “полярная аминокислота” относится к гидрофильным аминокислотам, боковые цепи которых предпочтительно находятся в водном окружении. Такие аминокислоты обычно располагаются на поверхности белка. К таким аминокислотам обычно относятся аминокислоты, которые содержат полярные боковые цепи, имеющие функциональную группу, такую как кислотная, амидная, спиртовая или аминогруппа, содержащую кислород или азот, который может образовывать водородную связь с водой. Примерами таких аминокислот являются Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S), Thr (T) и Tyr (Y). Cys (C) и Trp (W) также считаются слабо полярными.

Использованная в настоящем документе полярная и нейтральная аминокислота является полярной аминокислотой, которая содержит нейтральную боковую цепь. Примерами таких аминокислотных остатков для замен являются Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C) или Tyr (Y).

Использованный в настоящем документе термин “встречающиеся в природе аминокислоты” относится к 20 L-аминокислотам, встречающимся в полипептидах.

Использованный в настоящем документе термин “не природная аминокислота” относится к органическому соединению, содержащему

аминогруппу и карбоксильную группу, но не являющейся одной из встречающихся в природе аминокислот, перечисленных в таблице 2. Не встречающиеся в природе аминокислоты, таким образом, включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличные от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают D-стереоизомеры аминокислот, но не ограничиваясь этим. Примеры не природных аминокислот известны специалистам в данной области техники и могут быть включены в модифицированный полипептид ADA2.

Использованные в настоящем документе подходящие консервативные замены аминокислот хорошо известны специалистам в данной области техники и обычно могут быть осуществлены без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалистам в данной области техники понятно, что, в общем, единичные аминокислотные замены в неважных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., *например,*, Watson *et al.* Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). Такие замены можно осуществить в соответствии с примерами замен, которые приведены в таблице 3 ниже:

Таблица 3

Исходный остаток	Пример консервативной замены
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Другие замены также допустимы и могут быть определены опытным путем или в соответствии с известными консервативными заменами.

Использованный в настоящем документе термин конструкция ДНК представляет собой одно- или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, содержащую сегменты ДНК, комбинированные и помещенные рядом способом, не обнаруженным в природе. Конструкции ДНК существуют как результат манипуляций человека и включают клоны и другие копии молекул, полученных в результате таких манипуляций.

Использованный в настоящем документе термин сегмент ДНК представляет собой часть более крупной молекулы ДНК, имеющую заданные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий заданный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такой как плазмида или фрагмент плазмиды, которая при чтении в направлении от 5' к 3' кодирует последовательность аминокислот заданного полипептида.

Использованный в настоящем документе термин полинуклеотид означает одно- или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, считываемый в направлении от 5' к 3' концу. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированы *in vitro* или получены комбинацией природных и синтетических молекул. Длина молекул полинуклеотидов приводится в настоящем документе в нуклеотидах (сокращенно "нт") или в парах оснований (сокращенно "по"). Термин нуклеотид используется для одно- или двухцепочечных молекул, где допускается контекстом. Когда термин применяется для двухцепочечных молекул, он используется для обозначения общей длины и эквивалентен термину пара оснований. Специалистам в данной области техники будет понятно, что две цепи двухцепочечного полинуклеотида могут немного различаться в длину, и что их концы могут быть ступенчатыми; так что, все нуклеотиды в двухцепочечной молекуле полинуклеотида не могут быть спаренными. Длина таких неспаренных концов не будет, обычно, превышать 20 нуклеотидов.

Использованный в настоящем документе термин "первичная последовательность" относится к последовательности аминокислотных остатков в полипептиде.

Использованный в настоящем документе термин "сходство" между двумя белками или нуклеиновыми кислотами относится к родству между последовательностями аминокислот белков или нуклеотидными последовательностями нуклеиновых кислот. Сходство может быть основано на степени идентичности и/или гомологии последовательностей остатков, содержащихся в ней. Способы оценки степени сходства между белками или нуклеиновыми кислотами известны специалистам в данной области. Например, при одном способе оценки сходства последовательности, две аминокислотные или нуклеотидные последовательности выравнивают таким образом, чтобы добиться максимального уровня идентичности между последовательностями. "Идентичность" относится к степени, в которой аминокислотные или нуклеотидные последовательности инвариантны. Выравнивание аминокислотных последовательностей и в некоторых случаях нуклеотидных последовательностей также может учитывать консервативные различия и/или частые замены аминокислот (или нуклеотидов). Консервативными различиями являются различия, при которых сохраняются физико-химические свойства вовлеченных остатков. Выравнивания могут быть глобальными (выравнивание сравниваемых последовательностей по всей длине последовательностей и включая все остатки) или локальными (выравнивание части последовательностей, которая включает только наиболее похожую область или области).

Использованные в настоящем документе термины “гомология” и “идентичность” являются взаимозаменяемыми, но гомология в случае белков может включать изменения консервативных аминокислот. В целом, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот выравнивают таким образом, чтобы добиться максимального количества совпадений (см., *например,*: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M

Stockton Press, New York, 1991; Carrillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073).

Использованный в настоящем документе термин "идентичность последовательностей" относится к числу идентичных аминокислот (или пар оснований) при сравнении тестируемого полипептида или полинуклеотида и полипептида или полинуклеотида сравнения. Гомологичные полипептиды относятся к заранее установленному числу идентичных или гомологичных аминокислотных остатков. Гомология включает консервативные аминокислотные замены, а также идентичные остатки. Идентичность последовательности можно определить с помощью программ со стандартными алгоритмами выравнивания, в которых штрафы за разрывы устанавливаются по умолчанию каждым поставщиком. Гомологичные молекулы нуклеиновых кислот относятся к заранее установленному числу идентичных или гомологичных нуклеотидов. Гомология включает замены, которые не изменяют кодируемую аминокислоту (*m.e.*, "молчащие замены"), а также идентичные остатки. По существу гомологичные молекулы нуклеиновых кислот гибридизуются, как правило, в умеренно жестких условиях или в условиях высокой жесткости вдоль всей длины нуклеиновой кислоты или вдоль, по меньшей мере, примерно 70%, 80% или 90% от всей длины интересующей молекулы нуклеиновой кислоты. Предусмотрены также молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат вырожденные кодоны вместо кодонов в гибридизующейся молекуле нуклеиновой кислоты. (Для определения гомологии белков, консервативные, а также идентичные аминокислоты могут быть выровнены; в этом случае, процент идентичности и процент гомологии отличаются). Являются ли любые две молекулы нуклеиновых кислот, имеющие нуклеотидные последовательности (или любые два полипептида, имеющие аминокислотные последовательности), по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% "идентичными", можно определить, используя известные компьютерные алгоритмы, такие как программа "FAST A", с использованием, например, таких параметров по умолчанию, как описано в Pearson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) (другие программы включают пакет программ GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(I):

387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S.F., *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) и Carrillo *et al. SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Например, функция BLAST базы данных Национального центра биотехнологической информации может быть использована для определения идентичности. Другие коммерчески или публично доступные программы включают программу DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) и программу "Gap" (Madison WI) Генетической Компьютерной Группы Университета Висконсин (UWG). Процент гомологии или идентичности белков и/или молекул нуклеиновой кислоты может быть определен, например, путем сравнения информации о последовательности с использованием компьютерной программы GAP (*например,* Needleman *et al. J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), в редакции Smith и Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). Кратко, программа GAP определяет сходство как количество выровненных символов (*m.e.*, нуклеотидов или аминокислот), которые совпадают, разделенное на общее число символов в наименьшей из двух последовательностей. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) унарную матрицу сравнения (содержащую величину 1 для идентичных элементов и 0 для не идентичных элементов) и взвешенную матрицу сравнения Gribskov *et al. Nucl. Acids Res.* 14: 6745 (1986), как описано Schwartz и Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) штраф 3.0 за каждый разрыв и дополнительный штраф 0.10 за каждый символ в каждом разрыве; и (3) отсутствие штрафа за концевые разрывы.

Таким образом, использованный в настоящем документе термин "идентичность" представляет сравнение между тестируемым полипептидом или полинуклеотидом и полипептидом или полинуклеотидом сравнения. В одном неограничивающем примере, “по меньшей мере, на 90% идентичны” относится к проценту идентичности от 90 до 100% по отношению к полипептиду сравнения. Идентичность на уровне 90% или больше свидетельствует о том, что если, например, сравнивают тестируемый полипептид и полипептид сравнения, имеющие длину 100 аминокислот, то не более 10% (*m.e.*, 10 из 100) аминокислот в тестируемом полипептиде отличается от полипептидов сравнения.

Аналогичное сравнение может быть проведено для тестируемого полинуклеотида и полинуклеотида сравнения. Такие различия могут представлять собой точечные мутации, случайным образом распределенные по всей длине аминокислотной последовательности или кластеризованные в одном или нескольких участках различной длины, вплоть до максимально допустимой, *например*, 10/100 аминокислотных различий (приблизительно 90% идентичности). Различия также могут быть результатом замены, вставок или делеций нуклеотидов или аминокислот. При уровне гомологии или идентичности примерно выше 85-90%, результат можно считать независимым от программы и набора параметров для разрывов; такие высокие уровни идентичности можно оценить легко, часто без программного обеспечения.

Также понятно, что использованные в настоящем документе термины “по существу идентичные” или “аналогичные” могут иметь разные определения в зависимости от контекста, понимаемого специалистами в соответствующей области техники, но которые специалист в данной области техники может признать.

Использованный в настоящем документе термин выровненная последовательность относится к применению гомологии (схожести и/или идентичности) для выравнивания соответствующих положений в последовательности нуклеотидов или аминокислот. Как правило, две или более последовательностей, которые на 50% или больше идентичны, являются выровненными. Выровненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, являющимся выровненными по соответствующим положениям, и может включать выровненные последовательности РНК, такие как EST или другие кДНК, выровненные с последовательностью геномной ДНК.

Использованный в настоящем документе термин "специфично гибридизуется" относится к отжиганию за счет комплементарного спаривания оснований молекулы нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотида) на целевой молекуле нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области техники известны *in vitro* и *in vivo* параметры, которые влияют на специфичную гибридизацию, такие как длина и состав конкретной молекулы. Параметры важные для *in vitro* гибридизации также включают температуру отжига и

отмывки, состав буфера и концентрацию солей. Примерами условий отмывки для удаления неспецифически связавшихся молекул нуклеиновых кислот в условиях высокой жесткости являются 0,1 x SSPE, 0,1% SDS, 65°C, и в условиях средней жесткости являются 0,2 x SSPE, 0,1% SDS, 50°C. Эквивалентные условия жесткости известны в данной области техники. Специалист может легко регулировать эти параметры, чтобы добиться специфичной гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты и целевой молекулы нуклеиновой кислоты, подходящей для конкретного применения.

Использованный в настоящем документе термин выделенный или очищенный полипептид или белок или их биологически активная часть представляют собой полипептид или белок или их биологически активную часть, по существу не содержащие клеточного материала или других загрязняющих белков из клетки или ткани, из которых получен белок, или по существу не содержащие исходных химических соединений или других химических соединений, если используется химический синтез. Препараты могут считаться по существу чистыми, если они не содержат легко обнаруживаемых стандартными способами анализа примесей, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемыми специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, или могут считаться по существу чистыми, если дальнейшая очистка заметно не изменяет физические и химические свойства, такие как, ферментативная и биологическая активности, вещества. Способы очистки соединений для получения по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области техники. По существу химически чистое соединение, тем не менее, может представлять собой смесь стереоизомеров. В таких примерах дальнейшая очистка может повысить специфическую активность соединения.

Таким образом, ссылка на выделенный или очищенных белок или его каталитически активную часть означает, что белок или его каталитически активная часть по существу не содержат клеточных примесей или других загрязняющих белков из клетки или ткани, из которых получен белок, или по существу не содержат исходных химических соединений или других

химических соединений, если используется химический синтез. Препараты могут считаться по существу чистыми, если они не содержат легко обнаруживаемых стандартными способами анализа примесей, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемыми специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, или могут считаться по существу чистыми, если дальнейшая очистка заметно не изменяет физические и химические свойства, такие как, протеолитическая и биологическая активности, вещества. Способы очистки белков для получения по существу химически чистых полипептидов известны специалистам в данной области техники.

Термин по существу не содержащий клеточного материала включает препараты белков, в которых белок отделен от клеточных компонентов клеток, из которых он был выделен или получен рекомбинантным способом. В одном из вариантов воплощения, термин по существу не содержащий клеточного материала включает препараты белковых протеаз, содержащие примерно менее 30% (по сухому весу) белков, не являющихся протеазами (также называются в настоящем документе загрязняющими белками), обычно, примерно менее 20% белков, не являющихся протеазами, или10% белков, не являющихся протеазами, или примерно менее 5% белков, не являющихся протеазами. Если белковую протеазу или ее активную часть получают рекомбинантным способом, это также означает, что белковая протеаза или ее активная часть по существу не содержат культуральной среды, *т.е.*, культуральная среда составляет менее, примерно менее или 20%, 10% или 5% от объема препарата белковой протеазы.

Использованный в настоящем документе термин по существу не содержащий исходных химических соединений или других химических соединений включает препараты белковых протеаз, в которых белок отделен от химических предшественников или других химических соединений, используемых в синтезе белка. Термин включает препараты белковых протеаз, содержащих примерно менее 30% (по сухому весу), 20%, 10%, 5% или меньше химических предшественников или небелковых химических соединений или компонентов.

Использованный в настоящем документе термин получение рекомбинантными способами с использованием методов рекомбинантных ДНК относится к применению хорошо-известных способов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых заклонированной ДНК.

Использованный в настоящем документе термин вектор (или плазмида) относится к дискретным элементам, которые используются для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетки либо для ее экспрессии, либо для репликации. Векторы, как правило, остаются эписомальными, но могут быть сконструированы векторы, способные интегрировать ген или его часть в хромосому генома. Также предусмотрены векторы, которые представляют собой искусственные хромосомы, такие как бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и применение таких переносчиков хорошо известно специалистам в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин экспрессия относится к процессу, с помощью которого нуклеиновая кислота транскрибируется в мРНК и транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если нуклеиновая кислота получена из геномной ДНК и если выбрана подходящая эукариотическая клетка-хозяин или организм-хозяин, экспрессия может включать процессинг, например, сплайсинг мРНК.

Использованный в настоящем документе термин вектор экспрессии включает векторы, способные экспрессировать ДНК, функционально связанную с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, способными влиять на экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать последовательности промотора и терминатора, и необязательно могут включать одну или несколько точек начала репликации, один или несколько селектируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и тому подобное. Векторы экспрессии обычно получают из плазмид или вирусной ДНК, или они могут содержать элементы и тех, и других. Таким образом, вектор экспрессии относится к конструкции рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плазмида, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяин, приводит к

экспрессии клонируемой ДНК. Соответствующие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области техники и включают те, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках и те, которые являются эписомальными или те, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

Использованный в настоящем документе термин вектор также включает “векторы на основе вируса” или “вирусные векторы”. Вирусные векторы представляют собой генно-инженерные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве переносчиков или шаттлов) экзогенных генов в клетки.

Использованный в настоящем документе термин “функционально” или “функционально связанные” в отношении сегментов ДНК означает, что сегменты расположены таким образом, что они функционируют согласовано в соответствии с тем, для чего они предназначены, *например,* для инициации транскрипции после промотора и раньше любых транскрибируемых последовательностей. Промотор обычно представляет собой домен, с которым связывается транскрипционный аппарат для инициации транскрипции и ее осуществления вдоль кодирующего сегмента до терминатора.

Использованный в настоящем документе термин человеческий белок представляет собой белок, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, присутствующей в геноме человека, включая все аллельные варианты и консервативные варианты. Вариант или модификация белка также представляют собой человеческий белок, если модификация основана на последовательности дикого типа или основной последовательности человеческого белка.

Использованный в настоящем документе термин "композиция" относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, быть водной, не водной или представлять собой любую их комбинацию.

Использованный в настоящем документе термин “комбинация” относится к любой ассоциации двух или более элементов, например, двух или более элементов, которые могут использоваться вместе. Например, комбинация

может включать белок ADA2 и другой терапевтический агент. Такие комбинации могут быть упакованы в виде наборов.

Использованный в настоящем документе термин набор представляет собой упакованную комбинацию, необязательно включающую инструкции по применению комбинации и/или другие реагенты и компоненты для такого применения.

Использованный в настоящем документе термин "готовое изделие" представляет собой продукт, который производится и продается. В рамках настоящей заявки, термин включает белки ADA2, например варианты белка ADA2, содержащиеся в упаковках.

Использованный в настоящем документе термин прямое введение относится к композиции, которая вводится без разбавления.

Использованный в настоящем документе термин лекарственная форма для однократного введения относится к лекарственной форме для применения только один раз. Как правило, лекарственная форма для однократного введения предназначена для прямого введения.

Использованный в настоящем документе термин лекарственная форма для многократного введения относится к лекарственной форме для повторных введений.

Когда в настоящем документе дозировка указывается в мг/кг субъекта, считается, что среднестатистический человеческий субъект имеет массу примерно 70 кг-75 кг, такую как 70 кг, и площадь поверхности тела (BSA) у него составляет 1,73 $м^2$.

Использованный в настоящем документе термин "заболевание или расстройство" относится к патологическому состоянию в организме, развившемуся по причине или в результате состояния, включая, инфекции, приобретенные состояния, генетические состояния, но не ограничиваясь этим, и характеризующемуся выявляемыми симптомами. Заболеваниями и расстройствами, представляющими интерес в контексте данного документа, являются любые, ассоциированные с неправильными или высокими уровнями аденозина.

Использованная в настоящем документе опухоль, также называемая новообразованием, представляет собой ненормальную массу ткани, образовавшуюся в результате пролиферации клеток с аномально высокой скоростью. Для опухолей может быть характерна частичная или полная потеря структурной организации и функциональной координации с нормальной тканью. Опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Использованный в настоящем документе термин опухоль включает гематопоэтические опухоли, а также солидные опухоли.

Злокачественные опухоли можно разделить на три основных типа. Карциномы представляют собой злокачественные опухоли, развивающиеся из эпителиальных структур (*например,* грудь, предстательная железа, легкое, толстая кишка, поджелудочная железа). Саркомы представляют собой злокачественные опухоли, развивающиеся из соединительных тканей или мезенхимальных клеток, таких как мышцы, хрящи, жир или кость. Лейкемии и лимфомы представляют собой злокачественные опухоли, развивающиеся из гематопоэтических структур (структуры, имеющие отношение к образованию клеток крови), в том числе из компонентов иммунной системы. Другие злокачественные опухоли включают опухоли нервной системы (*например,* нейрофиброматоз), герминогенные опухоли и бластные опухоли, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин неопластическое заболевание относится к любому расстройству, включающему рак, в том числе к развитию, росту, метастазированию и прогрессированию опухоли.

Использованный в настоящем документе термин рак обозначает заболевания, вызванные или характеризующиеся любым типом злокачественной опухоли, в том числе метастатический рак, лимфатические опухоли и рак крови. Примеры рака включают рак мочевого пузыря, мозга, груди, костного мозга, шейки матки, толстой кишки/прямой кишки, почек, печени, легкого/бронхов, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы, кожи, желудка, щитовидной железы или матки, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин “внутривенное введение” относится к доставке терапевтического агента напрямую в вену.

Использованный в настоящем документе термин контроль относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что не обрабатывается тестируемым параметром, или, если это образец плазмы, он может быть получен от нормального волонтера, у которого нет целевого состояния. Контроль также может быть внутренним контролем.

Использованный в настоящем документе термин нормальные уровни или значения специалистом в данной области техники может быть определен различными способами. Как правило, нормальные уровни относятся к уровням экспрессии маркера (например, аденозин, ADR или нуклеозидаза) среди здорового населения. Нормальные уровни (или уровни сравнения) основаны на измерениях образцов здоровых субъектов, например, из указанного источника (*т.е.,* кровь, сыворотка, ткань или другой источник). Часто нормальный уровень определяется как "нормальный диапазон", который, как правило, относится к диапазону значений средних 95% здоровой популяции. Значение сравнения в настоящем документе используется взаимозаменяемо с нормальным уровнем, но может отличаться от нормальных уровней в зависимости от субъектов или источника. Уровни сравнения, как правило, зависят от нормальных уровней конкретного сегмента популяции. Таким образом, для целей настоящего документа, нормальный уровень или уровень сравнения представляют собой заранее установленный стандарт или контроль, с которым можно сравнивать тестируемого пациента.

Использованный в настоящем документе термин повышенный уровень относится к любому уровню количества или экспрессии маркера, который выше заданного или нормального порогового уровня.

Использованный в настоящем документе термин биологический образец относится к любому образцу, полученному из живого или вирусного источника или другого источника макромолекул и биомолекул, и включает любые типы клеток или тканей субъекта, из которого нуклеиновая кислота или белок или другая макромолекула могут быть получены. Биологический образец может представлять собой образец, полученный напрямую из биологического источника или обрабатываемого образца. Например, выделенные

амплифицируемые нуклеиновые кислоты составляют биологический образец. Биологические образцы включают физиологические жидкости, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, и образцы тканей и органов из животных, в том числе биопсийные образцы опухолей, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин обнаружение включает способы, позволяющие визуализировать (глазом или с помощью прибора) белок или маркер. Белок может быть визуализирован с помощью антитела, специфичного к этому белку. Обнаружение белка также может облегчить слияние белка с меткой, включающей эпитопную метку или метку.

Использованный в настоящем документе термин “лечение” субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы у субъекта частично или полностью сняты или остаются неизменными после лечения. Таким образом, лечение включает профилактику, терапию и/или лечение. Профилактика относится к предотвращению возможного заболевания и/или предотвращению усугубления симптомов или прогрессирования заболевания.

Использованный в настоящем документе термин фармацевтически эффективный агент включает любой терапевтический агент или биологически активные агенты, в том числе, например, химиотерапевтические агенты, обезболивающие агенты, сосудосуживающие агенты, диспергирующие агенты, традиционные терапевтические лекарства, в том числе, низкомолекулярные лекарства и терапевтические белки, но не ограничиваясь этим.

Использованный в настоящем документе термин лечение означает любой способ облегчения или иного положительного изменения симптомов состояния, расстройства или заболевания.

Использованный в настоящем документе термин терапевтический эффект означает эффект в результате лечения субъекта, который изменяет, как правило, улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния, или который лечит заболевание или состояние. Терапевтически эффективное количество относится к такому количеству композиции, молекулы или соединения, после введения которого субъекту наблюдается терапевтический эффект.

Использованный в настоящем документе облегчение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, например, путем введения фармацевтической композиции или другого терапевтического агента, относится к любому уменьшению, постоянному или временному, длительному или кратковременному, симптомов или побочных эффектов состояния, такому как, например, уменьшение побочных эффектов, связанных с введением ADA2, например, варианта ADA2, или возникающих после такого введения.

Использованный в настоящем документе термин предотвращение или профилактика относится к снижению риска развития заболевания или состояния.

Использованный в настоящем документе термин “терапевтически эффективное количество” или “терапевтически эффективная доза” относятся к такому количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое, по меньшей мере, достаточно для получения терапевтического эффекта. Таким образом, это такое количество, которое необходимо для предотвращения, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптомов заболевания или расстройства.

Использованный в настоящем документе термин однократная доза относится к физически дискретным единицам, подходящим для человека и животных и упакованным по-отдельности, как известно в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин “субъект” относится к животному, в том числе к млекопитающему, такому как человеческое существо. Субъект может включать любое животное, такое как приматы, в том числе, люди, гориллы и обезьяны; грызуны, такие как, мыши и крысы; птицы, такие как, цыплята; жвачные животные, такие как, козлы, коровы, олени, овцы; свиньи и другие животные, но не ограничиваясь этим. Животные, не относящиеся к человеку, не подразумевают людей.

Использованный в настоящем документе термин пациент относится к человеческому субъекту, у которого наблюдаются симптомы заболевания или расстройства.

Использованный в настоящем документе термин примерно одинаковые означает нахождение в пределах количества, которое специалист в данной области техники считает одинаковыми или находящимися в допустимом диапазоне ошибок. Например, как правило, для фармацевтических композиций, количества в пределах, по меньшей мере, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% или 10% считаются примерно одинаковыми. Такое количество может варьировать в зависимости от терпимости субъектов к вариациям в конкретной композиции.

Использованные в настоящем документе формы единственного числа включают формы множественного числа, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка соединение, включающее или содержащее "внеклеточный домен" включает соединения с одним или множеством внеклеточных доменов.

Использованные в настоящем документе диапазоны и количества могут быть выражены как "примерно" конкретное значение или диапазон. Примерно также включает точное количество. Следовательно, "примерно 5 оснований" означает "примерно 5 оснований" и также "5 оснований".

Использованный в настоящем документе термин "необязательный" или "необязательно" означает, что последовательно описанные события или обстоятельства происходят или не происходят, и что описание включает примеры, в которых указанное событие или обстоятельство происходит, и примеры, в которых они не происходят. Например, необязательная защитная группа означает, что группа незамещена или замещена.

Использованные в настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, соответствуют широко используемым, общепризнанным аббревиатурам, или IUPAC-IUB комиссии по биохимической номенклатуре (см., (1972) *Biochem.* 11:1726).

B. АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА 2 (ADA2) И МОДУЛИРОВАНИЕ ОПОСРЕДОВАННОЙ АДЕНОЗИНОМ ИММУНОСУПРЕССИИ ОПУХОЛИ

В настоящем документе предусмотрены способы лечения заболеваний или состояний, таких как рак или опухоль, путем введения любого белка

аденозиндезаминазы 2 (ADA2), включая ее варианты или конъюгаты, субъекту. Внеклеточный аденозин участвует в регуляции критических биологических процессов, таких как иммуномодуляция (Blay, J. (2012) Encyclopedia of Cancer pp.49-52). В патофизиологических условиях, таких как опухолевое микроокружение (TME), концентрация внеклеточного аденозина быстро увеличивается в некоторых участках TME, в результате чего образуется иммуносупрессивная ниша, которая способствует росту опухоли. ADA2 модулирует уровни аденозина во внеклеточном окружении, тем самым влияя на сигналинг аденозина и аденозин-зависимую иммуносупрессию. ADA2 может снижать внеклеточные уровни аденозина за счет превращения аденозина в инозин, что приводит к уменьшению иммуносупрессивных эффектов в TME. Например, как показано в настоящем документе, введение ADA2 может подавлять аденозин-зависимую иммуносупрессию и может снижать рост опухоли *in vivo*.

1. Иммунитет против опухоли и ускользание от иммунологического надзора

Раковые клетки содержат опухолеспецифические антигены, которые распознаются иммунной системой. При иммунитете против опухоли цель иммунной системы – атаковать и уничтожать эти раковые клетки посредством иммунных клеток, включая цитотоксические Т клетки, естественные киллеры (NK) и макрофаги. Например, CD4+ и CD8+ Т клетки способны активироваться при распознавании антигенных пептидов, презентированных на антигенпрезентирующих клетках в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I или класса II, соответственно. Активированные CD8+ клетки или цитотоксические Т клетки способны убивать опухолевые клетки, экспрессирующие антиген, чему может способствовать присутствие CD4+ Т клеток. Помимо прямых уничтожающих эффектов цитотоксических Т клеток, Т клетки также продуцируют различные цитокины и хемокины, которые могут рекрутировать другие эффекторные иммунные клетки, такие как нейтрофилы, макрофаги и NK клетки, в опухолевое микроокружение. NK клетки способны напрямую убивать раковые клетки.

Исследования продемонстрировали, что иммунная система способна предотвращать рост опухоли. Например, у иммунодефицитных мышей может чаще развиваться рак, чем у мышей дикого типа (Dunn *et al.* (2004) *Immunity*, 21:137-48). Было показано, что лимфоциты и IFN-гамма совместно предотвращают образование индуцируемой канцерогеном саркомы и спонтанной эпителиальной карциномы (Shankaran *et al.* (2001) *Nature*, 410:1107-1111). Кроме того, была показана роль NK клеток в отторжении опухолей у мышей с направленно редактированным геном и у мышей с удаленной субпопуляцией лимфоцитов. Например, было обнаружено, что мыши с удаленными NK и NK1.1+ T клетками сильнее подвержены образованию опухолей по сравнению с контрольными мышами, и аналогичный результат был получен при лечении мышей антителом против сиало-GM1, которое селективно элиминирует NK клетки (Smyth *et al.* (2001) *Int Immunol.*, 13;459-63). Кроме того, число, тип и расположение опухолевых иммунных инфильтратов в первичных опухолях являются прогностическими факторами для выживаемости людей, больных раком (Pages *et al.* (2005) *N Engl J Med*, 353:2654-2666).

Большинство опухолей, тем не менее, ускользают от иммунной системы. Опухолевое микроокружение является сложным и включает целый ряд иммуносупрессивных механизмов, присущих опухолевым клеткам или опосредованных другими клетками или молекулами. Посредством этих механизмов, как таковых или в комбинации, иммунная система может способствовать прогрессированию опухоли. Эти механизмы включают элиминацию антигенов опухолевых клеток, вызывающих иммунный ответ; предотвращение или понижающую регуляцию экспрессии лигандов, необходимых для иммунной активации, таких как главный комплекс гистосовместимости класса I (MHC I); продукцию иммуносупрессивных медиаторов, таких как интерлейкин-10 (IL-10), трансформирующий фактор роста-β или аденозин; рекрутинг субпопуляций иммунных клеток, которые супрессируют эффекторную функцию иммунных клеток, таких как T регуляторные клетки (Treg) или супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC); или повышающая регуляция ингибиторов иммунных клеток, таких как антиген цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4), которые

могут ослаблять эффекторную функцию Т-клеток, но не ограничиваясь этим. Например, аденозин является важным иммуносупрессивным агентом в опухолевом микроокружении.

2. Иммуномодуляция аденозином в раковом и опухолевом микроокружении (TME)

Аденозин (аденин-9-β-D-рибофуранозид; Ado) представляет собой нуклеозид, входящий в состав адениновых нуклеотидов (AMP, ADP и ATP), которые широко участвуют в клеточном энергетическом обмене и выступают в качестве молекул-предшественников во многих процессах. Аденозин может существовать в свободной форме как внутри, так и снаружи клеток.

Аденозин является важной *in vivo* сигнальной молекулой, особенно в иммунной системе. В частности, аденозин является хорошо известным эффектором иммунной функции. В Т-клетках аденозин снижает индуцированную Т-клеточным рецептором активацию NF-κB и ингибирует IL-2, IL-4 и IFN-γ. Аденозин уменьшает цитотоксичность Т-клеток, увеличивает анергию Т-клеток и увеличивает дифференциацию Т-клеток в $Foxp3^+$ или $Lag\text{-}3^+$ регуляторные Т клетки. Аденозин уменьшает продукцию IFN-γ NK клетками и супрессирует цитотоксичность NK клеток. Аденозин блокирует адгезию и экстравазацию нейтрофилов, уменьшает фагоцитоз и уменьшает уровни супероксида и оксида азота. Аденозин также снижает экспрессию TNF-α, IL-12 и MIP-1α на макрофагах, снижает экспрессию MHC класса II и повышает уровни IL-10 и IL-6. Кроме того, аденозин уменьшает фагоцитоз и уровни супероксида и оксида азота на макрофагах (Stagg and Smyth (2010) Oncogene 29:5346-5358).

На Фигуре 2 приведена схема биосинтеза и катаболизма аденозина. Внеклеточный аденозин продуцируется последовательной активностью мембраноассоциированных эктоферментов, CD39 и CD73, совместно продуцирующих аденозин за счет фосфогидролиза ATP или ADP, которые высвобождаются из мертвых или гибнущих клеток. CD39 (также называемый эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролазой; SEQ ID NO: 542) превращает внеклеточный ATP (или ADP) в 5'AMP. Далее, CD73 (также называемый 5'-нуклеотидазой; SEQ ID NO: 543) превращает 5'AMP в аденозин. Активность

CD39 является обратимой за счет действия NDP киназы и аденилаткиназы, тогда как активность CD73 является необратимой. CD39 и CD73 экспрессируются на опухолевых стромальных клетках, включая эндотелиальные клетки и Treg, и также на многих других раковых клетках. Например, экспрессия CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках увеличивается в условиях гипоксии опухолевого микроокружения. Опухолевая гипоксия может быть следствием недостаточного кровоснабжения и неорганизованной сосудистой сети опухоли, нарушающих доставку кислорода (Carroll and Ashcroft (2005), *Expert. Rev. Mol. Med.* 7(6):1-16). Гипоксия также ингибирует аденилаткиназу (AK), которая превращает аденозин в AMP, в результате чего внеклеточная концентрация аденозина сильно повышается. Таким образом, аденозин высвобождается в высоких концентрациях в ответ на гипоксию, состояние, которое часто встречается в опухолевом микроокружении (TME), в солидных опухолях или вокруг них.

Таким образом, в то время как концентрация аденозина в тканях и в крови, как правило, низкая, локальная концентрация аденозина может быть значительно увеличена вследствие повреждения или стресса, например, воспаления, ишемии и гипоксии. Например, внеклеточная концентрация аденозина в гипоксическом опухолевом микроокружении может составлять до 10 мкМ аднозина, что примерно в 100 раз выше, чем обычная внеклеточная концентрация аденозина, составляющая приблизительно 0,1 мкМ (Antonioli *et al.* (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Так как области гипоксии в опухолях сосредоточены вокруг микрососудов, локальная концентрация аденозина в области опухоли в действительности может быть выше.

Иммуномодуляция аденозином происходит после его высвобождения во внеклеточное пространство опухоли и активации аденозиновых рецепторов (ADR) на поверхности целевых иммунных клеток, раковых клеток или эндотелиальных клеток. Существует четыре типа ADR, A_1 (SEQ ID NO: 533), A_{2A} (SEQ ID NO: 534), A_{2B} (SEQ ID NO: 535) и A_3 (SEQ ID NO: 536-538), каждый из которых представляет собой рецептор, связанный с G-белком, с разной аффинностью к аденозину и разными нисходящими сигнальными путями. Активация рецепторов A_1 и A_3 приводит к уменьшению уровней внутриклеточного циклического AMP (cAMP), а активация рецепторов A_{2A} и A_{2B}

приводит к увеличению уровней cAMP за счет активации аденилатциклазы. Каждый из A_1, A_{2A} и A_3 может быть активирован физиологическими концентрациями аденозина (например, 30-300 нМ), но A_{2B} обладает более низкой аффинностью к аденозину и для его активации требуются более высокие уровни аденозина (Stagg *et al.* (2010) Oncogene, 29:5346-5358). Результат активации ADR различается в зависимости от типа клеток и типа рецептора: активация ADR может привести к активации или супрессии клеточной функции или гибели клетки (Antonioli *et al.* (2013) Nat Rev Can 13:842-857). На клетках могут присутствовать все четыре типа рецепторов в опухолевом микроокружении, в том числе на раковых клетках, стромальных клетках, эндотелиальных клетках, воспалительных и иммунных клетках, и каждый может быть активирован концентрациями аденозина, присутствующими в опухолевом микроокружении.

Высокие уровни аденозина в опухолевом микроокружении приводят к локальной иммуносупрессии, что ограничивает способность иммунной системы элиминировать раковые клетки. Например, аденозин может супрессировать различные функции Т лимфоцитов, естественных киллеров (NK), полиморфно-ядерных гранулоцитов и фагоцитирующих клеток, таких как тканевые макрофаги. В частности, известно, что рецептор A_{2A} экспрессируется на моноцитах, макрофагах, тучных клетках, гранулоцитах, лимфоцитах, дендритных клетках (DC), NK клетках и эндотелиальных клетках, и его экспрессия на многих типах клеток индуцируется гипоксией (Stagg and Smyth (2010) Oncogene, 29:5346-5358). Было показано, что активация A_{2A} супрессирует функцию NK клеток, ингибирует пролиферацию Т-клеток, ингибирует цитотоксичность Т клеток и продукцию цитокинов Т-клетками и ингибирует активацию макрофагов (Stagg and Smyth (2010); Antonioli *et al.* (2013)). Было показано, что активация A_{2B} супрессирует дифференциацию DC, тем самым ограничивая активацию Т клеток и способствуя экспансии и накоплению MSDC (Stagg and Smyth (2010); Antonioli *et al.* (2013)).

Помимо прямых эффектов, ингибирующих иммунную систему, аденозин также может контролировать рост и распространение раковых клеток путем воздействия на пролиферацию раковых клеток, апоптоз и ангиогенез. Например, аденозин может способствовать ангиогенезу, в первую очередь, за счет

стимуляции рецепторов A_{2A} и A_{2B}. Стимуляция рецепторов на эндотелиальных клетках может регулировать экспрессию внутриклеточной молекулы адгезии 1 (ICAM-1) и Е-селектина на эндотелиальных клетках, поддерживать целостность сосудов и способствовать росту сосудов (Antonioli *et al.* (2013)). Кроме того, активация аденозином одного или нескольких A_{2A}, A_{2B} или A_3 на различных клетках может стимулировать продукцию про-ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкин-8 (IL-8) или ангиопоэтин 2 (Antonioli *et al.* (2013)).

Аденозин также направленно регулирует пролиферацию, апоптоз и метастазирование опухолевых клеток за счет взаимодействия с рецепторами на раковых клетках. Например, исследования показали, что активация рецепторов A_1 и A_{2A} способствует пролиферации опухолевых клеток в некоторых клеточных линиях рака груди, а активация рецепторов A_{2B} способствует росту раковых клеток карциномы толстой кишки (Antonioli *et al.* (2013)). Аденозин также запускает апоптоз раковых клеток, и в различных исследованиях была показана взаимосвязь этой активности с активностью внешнего пути апоптоза через A_3 или внутреннего пути апоптоза через A_{2A} и A_{2B} (Antonioli *et al.* (2013)). Кроме того, аденозин может способствовать миграции и метастазированию опухолевых клеток за счет увеличения подвижности клеток, адгезии клеток к внеклеточному матриксу и экспрессии белков адгезии клетки и рецепторов для стимуляции подвижности клеток.

3. Аденозиндезаминаза и направленное действие на аденозин в лечении рака

Уровни аденозина могу регулироваться действием аденозиндезаминазы (ADA), представляющей собой фермент, который превращает аденозин в инозин или 2'-дезоксиаденозин в 2'-дезоксиинозин. В частности, ADA превращает либо аденозин, либо дезоксиаденозин, в присутствии в воды, в инозин или дезоксиинозин и аммоний по следующей схеме: аденозин + H_2O = инозин + NH_3 или 2'-дезоксиаденозин + H_2O = 2'-дезоксиинозин + NH_3. Увеличение аммония в локальном опухолевом микроокружении может привести к увеличению pH.

У человека существует два типа ADA, ADA1 и ADA2. ADA1 повсеместно присутствует внутри клеток и обладает схожей аффинностью связывания в

отношении аденозина и в отношении 2'дезоксиаденозина с Km, раной примерно 5,2 x 10^{-5} M. ADA1 главным образом функционирует внутриклеточно, снижая уровни аденозина, которые могут быть токсичными для клеток, таких как лимфоциты. Например, дефицит аденозиндезаминазы 1 (ADA1) связан как с легким иммунодефицитом, так и с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), из-за токсического накопления аденозина в незрелых лимфоидных клетках, которое приводит к гибели лимфоцитов апоптозом и глубокому истощению популяций T, B и NK клеток (Hershfield, M.S. (2005) Eur. J. Immunol. 35:25-30). Наоборот, ADA2 содержит сигнальную последовательность секреции, и преимущественно является внеклеточной ADA. Большинство активностей ADA в нормальной сыворотке или плазме человека опосредуются ADA2 (Neidzwicki and Aberneth (1991) *Biochemical Pharmacology* 41:1615-1624). ADA2 обладает гораздо более низкой аффинностью связывания в отношении аденозина с Km, равной примерно 200 x 10^{-5} M, и обладает даже еще более низкой аффинностью в отношении 2'дезоксиаденозина. Также, в отличие от ADA1, ADA2 имеет кислый оптимум pH.

Перспективным вариантом лечения опухолей и рака является уменьшение специфического для опухоли накопления аденозина в TME. Авторами настоящего изобретения обнаружено, что рекомбинантные формы ADA2 могут быть введены субъекту для селективного действия в TME, где они могут уменьшать внеклеточные уровни аденозина за счет дезаминирования аденозина до инозина, тем самым обращая иммуносупрессивный эффект аденозина. В частности, ADA2 представляет собой внеклеточную аденозиндезаминазу, оптимизированную для высоких концентраций аденозина. Как обсуждалось выше, аденозин активно продуцируется в TME, и концентрация аденозина в областях TME может быть примерно в 100 раз выше, чем в другом тканевом окружении. Из-за наличия гидрофобного кармана для связывания субстрата, обсуждаемого ниже, K_m ADA2 для связывания аденозина приблизительно в 100 раз выше, чем K_m ADA1. Тем не менее, скорость оборота (k_{cat}) ADA2 аналогичная скорости оборота ADA1. Поскольку ADA2 имеет аналогичную скорость оборота, но более низкую аффинность в отношении аденозина, она может селективно действовать в среде с высокой концентрацией

аденозина, такой как TME или очаг воспаления, не влияя на метаболизм аденозина в нормальном микроокружении с более низкой концентрацией аденозина.

Результаты, приведенные в настоящем документе, демонстрируют, что рекомбинантная ADA2 селективно действует в опухолевом микроокружении. Кроме того, результаты, приведенные в настоящем документе, подтверждают, что аденозин опосредует иммуносупрессию в Т клетках и NK клетках, и что эта супрессия может быть обратима введением аденозиндезаминазы 2 (ADA2). Благодаря селективности активности ADA2 по снижению уровней аденозина в TME могут быть ограничены нежелательные побочные эффекты, которые могли возникать из-за того, что активность ADA2 была менее селективной. Например, использование многих терапевтических препаратов для лечениях опухолей ограничено, потому что их использованием может привести к нежелательным побочным эффектам у субъекта из-за отсутствия специфичности или селективности. Использование ADA2, ее вариантов или конъюгатов, в способах, предусмотренных в настоящем документе, может привести к меньшим нежелательным побочным эффектам и/или улучшению эффективности за счет возможности использовать более высокую дозу.

Таким образом, ADA2 обладает преимуществами по сравнению с ADA1. Помимо различий в аффинности связывания с аденозином, которые позволяют использовать ADA2 в качестве молекулы, селективно действующей на опухоль, ADA1 также не предназначена для использования во внеклеточной среде. Например, ADA1 *in vivo* действует, в первую очередь, внутриклеточно, и значительно мене стабильна во внеклеточной среде, такой как плазма, как показано в результатах, предусмотренных в настоящем документе. Наоборот, ADA2 демонстрирует увеличенную стабильность во внеклеточной среде благодаря сильному гликозилированию, которое защищает молекулу от протеолиза во внеклеточной среде, и консервативным дисульфидным связям. ADA2 также значительно более стабильна при более высоких температурах по сравнению с ADA1 (Daddona и Kelley (1981) Biochim. Biophys. Acta 658:280-290). Авторами настоящего изобретения обнаружено, что ADA2 обладает более

высокой термостабильностью, и что ADA2 также более стабильна по сравнению с ADA1 во внеклеточной среде, такой как плазма.

ADA2 также демонстрирует оптимальную активность в средах, которые обычно характерны и могут быть обнаружены в TME, например, в средах, имеющих кислый pH. Например, оптимальный pH для ADA2 дикого типа приблизительно составляет 6,5, тогда как для ADA1 оптимальный pH равен 7,5. TME представляет собой сложное микроокружение внутри и вокруг опухоли, состоящее из разнообразных типов клеток и имеющее разные внеклеточные условия. В TME обычно есть области, где внеклеточная среда является кислой, что вызвано присутствием в них молочной кислоты и других кислых метаболитов, продуцируемых в процессе анаэробного гликолиза в условиях гипоксии в опухоли (Kato *et al.* (2013) Cancer Cell International 13:89).

Кроме того, ADA2 позволяет также преодолеть другие проблемы, связанные с существующими терапевтическими препаратами, включая те, мишенью которых является аденозин. Например, поскольку аденозин имеет множество рецепторов, затруднительно действовать на него с помощью антитела против ADR, поскольку все четыре ADR рецептора присутствуют в TME и могут быть активированы аденозином. Следовательно, направленное действие на единственный рецептор не приведет к полному подавлению иммуномодулирующей активности аденозина.

Таким образом, предусмотренные в настоящем документе способы включают способы лечения с использованием любой ADA2, например, рекомбинантной человеческой ADA2 (rHuADA2) или ее вариантов и/или конъюгатов, для лечения заболеваний или состояний, таких как рак или опухоль и другие заболевания или состояния, связанные с неправильным образованием или накоплением аденозина. Также в настоящем документе предусмотрены варианты и модифицированные формы ADA2, обладающие измененными свойствами, такими как пониженное связывание с гепарином, увеличенная каталитическая эффективность, увеличенная стабильность, измененный статус гликозилирования и/или измененный оптимум pH. Любой белок ADA2 может быть использован в способах лечения, предусмотренных в настоящем документе. Также в настоящем документе предусмотрены способы

комбинированной терапии с использованием любой ADA2 и других иммуномодулирующих агентов, химиотерапевтических агентов, ингибиторов иммунных контрольных точек или деградирующих гиалуронан ферментов, таких как растворимая гиалуронидаза или конъюгированная с полимером растворимая гиалуронидаза (*например,* PEGPH20).

C. АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА 2 (ADA2) И ЕЕ ВАРИАНТЫ

Предусмотрены способы лечения с использованием аденозиндезаминазы 2 (ADA2), включая человеческую ADA2 дикого типа, варианты и/или конъюгаты ADA2 или другие ее модифицированные формы. Также в настоящем документе предусмотрены варианты ADA2 с измененными свойствами. ADA2 также могут использоваться для регулирования уровней аденозина в среде, где необходимо регулировать аденозинзависимую иммуномодуляцию или другие аденозинзависимые активности, например, в опухолевом микроокружении или при воспалении.

1. Структура и активность ADA2

Аденозиндезаминазы представляют собой ферменты, превращающие аденозин в инозин. Известно три ADA: ADA1, ADA2 и ADA3, хотя активность ADA3 не была показана. Что касается белков с измененной активностью аденозиндезаминазы, у людей существуют обе ADA2 и ADA1, тогда как у мух, гомолог ADA2 (известный как ADGF гомолог) является единственным активным ферментом аденозиндезаминазой, а грызуны имеют только ADA1, что свидетельствует о том, что два белка имеют перекрывающиеся, но разные функции. Разные функции связаны с различием в экспрессии, клеточной локализацией и кинетическими свойствами ферментативной активности, различием в других структурных свойствах, а также с дополнительным функционирование в качестве фактора роста и свойством связывания с гепарином (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377).

ADA1 и ADA2 имеют аналогичную структуру и общий каталитический механизм превращения аденозина в инозин, но их последовательности обладают небольшим сходством. ADA2 имеет нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, которая кодирует белок длиной 511 аминокислот, приведенный в SEQ ID NO:2, который содержит сигнальную

последовательность (соответствует аминокислотным остаткам 1-29 в SEQ ID NO:2). Зрелая ADA2 представляет собой секретируемый белок, у которого отсутствует сигнальная последовательность и имеется последовательность аминокислот, приведенная в SEQ ID NO: 5. ADA1 имеет нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, которая кодирует белок длиной 363 аминокислот, не содержащий сигнальную последовательность, и имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 12. N-концевой остаток метионина отщепляется, в результате чего образуется зрелый белок длиной 362 аминокислоты, приведенный в SEQ ID NO:66.

Как более подробно обсуждается ниже, по сравнению с ADA1, ADA2 значительно длиннее и включает дополнительные 80–100 аминокислот на N-конце, которые участвуют в димеризации и в связывании с гликозаминогликаном (*например,* с гепарином) (Maier *et al.* (2005) Mol Evol 61:776–794). ADA2 также имеет дополнительный предполагаемый домен связывания с рецептором (PRB), который, как сообщается, опосредует связывание с рецепторами клеточной поверхности и/или вносит вклад в функционирование ADA2 в качестве фактора роста или в другие сигнальные функции. Также, в отличие от ADA1, ADA2 находится в димерной форме и секретируется, тогда как ADA1 находится в мономерной форме и является преимущественно внутриклеточной. ADA2 также интенсивно гликозилирована и имеет консервативную дисульфидную связь. Структурные и функциональные свойства ADA2, включая большую стабильность и увеличенную селективность в отношении опухоли, но не ограничиваясь этим, дают ей преимущество для использования в качестве терапевтической молекулы.

a. Структура ADA2

ADA2, также известная как фактор роста из дендритных клеток (DCDGF) или фактор роста с активностью аденозиндезаминазы (ADGF), является представителем семейства белков ADGF. ADA2 обнаружена только в эукариотах и, преимущественно, в многоклеточных организмах. Наоборот, ADA1 обнаружена как в прокариотах, так и в эукариотах. В частности, гомологи ADA2/ADGF были охарактеризованы у насекомых и других позвоночных, таких как *Xenopus laevis,* а также у человека. Семейство белков ADGF у насекомых

изначально идентифицировали в качестве белков, обладающих активностью фактора роста, а позднее как обладающих также активностью аденозиндезаминазы.

У человека ADA2 кодируется критической областью гена синдрома кошачьего глаза 1 (CECR1) (Riazi *et al.* (2000) Genomics 64:277-285). Человеческий ген CECR1 (нуклеотидная последовательность кодирующей области приведена в SEQ ID NO: 1) кодирует белок-предшественник длиной 511 аминокислот (последовательность приведена в SEQ ID NO:2; учетный номер в Uniprot Q9NZK5). ADA2 имеет N-концевую сигнальную последовательность длиной 29 остатков (аминокислотные остатки в положениях 1-29 в SEQ ID NO:2), которая отщепляется после транспорта в ER с образованием зрелого белка длиной 482 аминокислот (последовательность приведена в SEQ ID NO: 5). Зрелый белок ADA2 существует в виде гомодимера из-за неполярного взаимодействия между двумя полипептидными цепями. Также сообщалось о других последовательностях человеческой ADA2, *см., например,* патент США номер 5,968,780 (форма предшественника SEQ ID NO:376 и зрелая форма SEQ ID NO:380), учетный номер в NCBI BAG369969.1 (форма предшественника SEQ ID NO:377 и зрелая форма SEQ ID NO:381); учетный номер в NCBI AAF65941 (форма предшественника SEQ ID NO:378 и зрелая форма SEQ ID NO:382); и учетный номер в NCBI AAH51755 (форма предшественника SEQ ID NO:379 и зрелая форма SEQ ID NO:383). Не каноническая вторая изоформа, образуемая в результате альтернативного сплайсинга мРНК, кодирует более короткий белок длиной 270 аминокислот (последовательность приведена в SEQ ID NO:68; учетный номер в Uniprot Q9NZK5-2), у которого отсутствует 241 N-концевая аминокислота и который содержит последовательность длиной 10 аминокислот на N-конце, отличающуюся от канонической изоформы.

Примеры гомологов ADA2 в других видах включают ADA2 из *Pan troglodytes* (шимпанзе; форма-предшественник SEQ ID NO:286, зрелая форма SEQ ID NO:326; учетный номер в NCBI XP_003317127.1); *Gorilla gorilla* (горилла; форма-предшественник SEQ ID NO:287, зрелая форма SEQ ID NO:327; учетный номер в NCBI XP_004063024.1); *Pan paniscus* (карликовый шимпанзе; форма-предшественник SEQ ID NO:288, зрелая форма SEQ ID

NO:328; учетный номер в NCBI XP_003828345.1); *Pongo abelii* (суматранский орангутан; форма-предшественник SEQ ID NO:289, зрелая форма SEQ ID NO:329; учетный номер в NCBI NP_001125360.1); *Nomascus leucogenys* (северный белощёкий гиббон; форма-предшественник SEQ ID NO:290, зрелая форма SEQ ID NO:330; учетный номер в NCBI XP_004088517.1); *Macaca fascicularis* (макак-крабоед; форма-предшественник SEQ ID NO:291, зрелая форма SEQ ID NO:331; учетный номер в NCBI XP_005568111.1); *Chlorocebus sabaeus* (зеленая мартышка; форма-предшественник SEQ ID NO:292, зрелая форма SEQ ID NO:332; учетный номер в NCBI XP_007972990.1); *Macaca mulatta* (макак-резус; форма-предшественник SEQ ID NO:293, 337, зрелая форма SEQ ID NO:333, 340; учетные номера в GenBank AFH32795.1, EHH20002.1); *Callithrix jacchus* (игрунка; форма-предшественник SEQ ID NO:294, 374, зрелая форма SEQ ID NO:334, 375; учетный номер в NCBI XP_009004591.1, XP_009004586.1); *Xenopus laevis* (африканская шпорцевая лягушка; форма-предшественник SEQ ID NO:295, зрелая форма SEQ ID NO:335; учетный номер в NCBI NP_001090531.1); *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка; форма-предшественник SEQ ID NO:296-300, зрелая форма SEQ ID NO:336, 338, 339; AAL40913.1, AAL40920.1, AAL40911.1, AAL40912.1 и AAL40910.1); *Bombyx mori* (тутовый шелкопряд; форма-предшественник SEQ ID NO:301, зрелая форма SEQ ID NO:341; учетный номер в NCBI NP_001098698.1); и *Sarcophaga perigrina* (мясная муха; форма-предшественник SEQ ID NO:302, зрелая форма SEQ ID NO:342; учетный номер в GenBank BAA11812.1), но не ограничиваясь этим.

Доменная организация ADA2 описана в Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377. ADA2 содержит коровый ADA домен или каталитический домен, который составляет более 70% аминокислотной последовательности, и структурно аналогичен ADA домену в ADA1. В мономере, ADA домен состоит из восьми цепей параллельных α/β бочек, которые окружают центральный глубокий карман, представляющий собой активный сайт. Кроме того, ADA домен также содержит три дополнительные петли, расположенные между β1 цепью и α1 спиралью (обозначенные H1, H2 и H3), и две дополнительные спирали на C-конце (обозначенные H4 и H5). ADA

домен находится в области, соответствующей остаткам 106-502 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (соответствует остаткам 77-473 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5). В ADA области, ADA2 содержит вставку аминокислотных остатков по сравнению с ADA1, включая остатки, образующие предполагаемый домен связывания с рецептором (PRB) (обсуждается ниже), и не участвующие в каталитической функции ADA2. ADA домен не имеет высокой гомологии последовательности с ADA1 (18-21% идентичных остатков), но два ADA домена имеют высокое структурное сходство. В таблице 4 суммированы остатки в активном сайте, участвующие в связывании с субстратом и катализе.

Таблица 4

Остаток (нумерация предшественника, приведенного в SEQ ID NO:2)	**Активный сайт**
112	координирование Zn^2, каталитический
114	координирование Zn^2, каталитический
115	связывание субстрата
116	связывание субстрата
204	связывание субстрата
207	связывание субстрата
208	связывание субстрата
211	связывание субстрата
293	связывание субстрата
325	связывание субстрата
326	связывание субстрата
356	координирование Zn^2, каталитический
359	донор протона в активном сайте, связывание субстрата
384	акцептор протона в активном сайте, связывание субстрата
415	связывание субстрата
441	координирование Zn^2, каталитический, связывание субстрата
442	связывание субстрата

На основе опубликованной в Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377 кристаллической структуры комплекса ADA2 с коформицином (CF), ингибитором переходного состояния, который имитирует тетраэдрическое промежуточное соединение в положении C6 аденина, были идентифицированы

участки, участвующие в связывании субстрата. Такие остатки включают D115, I116, W204, F207, E208, F211, H293, V325, G326, E359, H384, L415, D441 и D442 в белке-предшественнике ADA2, приведенном в SEQ ID NO:2 (соответствуют остаткам D86, I87, W175, F178, E179, F182, H254, V296, G297, E330, H355, L386, D412 и D413 в зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5). Хотя ADA2 и ADA1 имеют схожие структурные особенности каталитического сайта, гидрофобный субстрат-связывающий карман в ADA домене ADA2 является более доступным (открытым) и содержит меньше гидрофобных остатков. Эти различия могут объяснять более низкую аффинность ADA2 к аденозину.

ADA2 представляет собой цинк-зависимую гидролазу, для проявления активности которой необходимо координирование со связанным цинком который действует как мощный электрофил, активирующий атакующую воду до гидроксид-иона. Аминокислотные остатки H112, H114, H356 и D441 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (соответствуют H83, H85, H327, D412 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) участвуют в координировании цинка в активном сайте. В процессе катализа, Zn^{++} способствует нуклеофильной атаке на карбонильной углерод атома кислорода молекулы воды в активном сайте. Комбинация E359, H384 и D441 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (соответствуют E330, H355 и D412 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5), выступает в качестве лигандов цинка. H384 и D441 позиционируют атакующую молекулу воды, E359 является каталитическим остатком-донором протона в активном сайте, который облегчает реакцию за счет «извлечения» протона из атакующей молекулы воды, и H384 служит в качестве акцептора протона. Остатки каталитического активного сайта структурно отражают соответствующие остатки активного сайта ADA1, что указывает на то, что обе аденозиндезаминазы имеют схожий каталитический механизм (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377).

Активная ADA2 существует в виде гомодимера. Димеризация ADA2 опосредована остатками в N-концевых α-спиралях ADA2, обозначенных HN1, HN2, HN3 и HN4 (соответствуют остаткам 29-105 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2, или остаткам 1-76 зрелой ADA2,

приведенной в SEQ ID NO: 5), а также остатками в С-концевой α-спирали, обозначенной H5 (соответствуют остаткам 503-511 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2, или остаткам 474-482 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5). Поскольку эти области обуславливают более чем 70% неполярных взаимодействий между субединицами, они обозначаются как домен димеризации. Первая N-концевая спираль, HN1, образует спиральный якорь из-за ионных взаимодействий остатков R34 и E41 (остатки R5 и E12 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) с остатками D373 и H391 (остатки D344 и H362 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) соседней субъединицы, и гидрофобных взаимодействий остатков I30, T33, L37, L38, K40 и M44 (остатки I1, T4, L8, L9, K11 и M15 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) с остатками соседней субъединицы. Гидрофобный связывающий карман образован остатками M71, A74, M75, L78 и F80, которые вмещают остаток W336 (остатки M42, A45, M46, L49 и F51 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) из соседней субъединицы.

ADA1, которая не образует димер, не содержит остатки, которые составляют "домен димеризации". Также, по сравнению с ADA1, остаток W336 в ADA2 вставлен в область активного сайта между β5 и α5, где он не напрямую участвует в каталитической активности вследствие его участия в димеризации. В результате замены W336G образуется молекула ADA2, которая частично диссоциирует на мономеры, и которая обладает измененной каталитической активностью (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). Помимо влияния на полную ферментативную активность, димеризация также связана с секрецией ADA2. Удаление аминокислот T33 и E41 (соответствуют T4 и E12 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) нарушает секрецию ADA2 в культуральную среду (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377).

ADA2 связывается с гликозаминогликанами (GAG), в том числе с гепарином и его аналогами, такими как гепарансульфат и хондроитинсульфат. В результате димеризации белка образуется большая, сильно положительно заряженная поверхность на поверхности раздела димера, которая образует GAG-связывающий сайт (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). В частности, GAG-связывающий сайт включает аминокислотные остатки вблизи

положений I30-R45, S389-T396 и R422-T428 белка-предшественника ADA2 (соответствуют I1-R16, S360-T367 и R393-T399 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5). По-видимому, взаимодействие с GAG играет роль в стабилизации димера ADA2.

ADA2 содержит вставку последовательности внутри каталитического домена, обозначаемую как предполагаемый домен связывания с рецептором (PRB), которая соответствует остаткам 127-185 или 134-177 белка-предшественника ADA2, приведенного в SEQ ID NO:2 (положения 98-156 или 105-148, соответственно, зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5). PRB домен сворачивается в хемокиноподобный домен, состоящий из α- и β-складки, образованной трехцепочечным антипараллельным β-слоем, окруженным α-спиралями с одной стороны и пролин-богатой петлей с другой стороны. Между положениями 137 и 159 белка-предшественника ADA2 (положения 108 и 130 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5) в PRB домене присутствует существует дисульфидная связь, необходимая для секреции ADA2 и структурной стабильности. Кристаллическая структура ADA2 показала, что PRB домен, не будучи вовлеченным в каталитическую функцию ADA2, находится на вершине аденозиндезаминазного (ADA) домена на границе активного сайта. Когда ADA2 димеризуется, два PRB домена в димере располагаются на одной стороне димера, и могут связываться с димерными рецепторами или индуцировать димеризацию рецепторов (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377; Zavialov *et al.* (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). ADA2 связывается с аденозиновыми рецепторами (ADR), которые представляют собой димерные рецепторы. PRB домен вовлечен в функционирование фермента в качестве фактора роста, за счет того, что обуславливает способность связываться с рецепторами (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377; Zavialov *et al.* (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). Таким образом, элиминация или модификация этого домена может снизить, ослабить или элиминировать эту активность.

ADA2 имеет четыре (4) нативных N-связанных сайтов гликозилирования в положениях N127, N174, N185 и N378 белка-предшественника ADA2 (соответствуют N98, N145, N156 и N349 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID

NO: 5). Три сайта N-гликозилирования находятся в PRB домене, в положениях N127, N174 и N185, и один находится на противоположной стороне молекулы, в положенииN378. Олигосахаридные цепи, расположенные с трех разных сторон молекулы ADA2, защищают фермент от протеолиза во внеклеточной среде, обеспечивая повышенную стабильность (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377).

b. Активности ADA2

ADA2 обладает несколькими активностями. ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы (ADA), которая катализирует реакции превращения аденозина в инозин (аденозин + H_2O = инозин + NH_3) и 2'-дезоксиаденозина в 2'-дезоксиинозин (2'-дезоксиаденозин + H_2O = 2'-дезоксиинозин + NH_3). Коформицин и 2'-дезоксикоформицин являются потенциальными ингибиторами ADA1 и ADA2. Тем не менее, из-за различий в субстрат-связывающем кармане ингибитор (+)-эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)аденин (EHNA) селективно ингибирует ADA1, но не ингибирует ADA2. Также, различия в субстрат-связывающем кармане объясняют различия в аффинности связывания с субстратом между ADA1 и ADA2. Например, несмотря на то, что значения k_{cat} для аденозина аналогичны для ADA2 и ADA1, поскольку их каталитические остатки имеют высокое структурное сходство, K_m ADA2 и ADA1 в отношении аденозина различаются. K_m ADA2 в отношении аденозина составляет приблизительно 2,25 мМ. Поскольку ADA2 имеет гидрофобный карман для связывания субстрата, аффинность ADA2 к ее субстратам отличается от аффинности ADA1. K_m ADA2 в отношении аденозина приблизительно в 100 раз выше, чем K_m ADA1, которая составляет приблизительно 0,1 мМ.

Оптимальный pH для активности ADA2 составляет примерно 6,5, и активность ADA2 уменьшается при pH выше 7,0. Наоборот, оптимальный pH для ADA1 составляет примерно 7,5. Разная аффинность в отношении субстрата и разный оптимум pH указывают на то, что ADA2 больше подходит для специфических микроокружений, и что фермент выполняет перекрывающиеся, но разные функции в регуляции концентрации аденозина и сигналинге (Zavialov *et al.* (2005) Biochem. J. 391:51-57). Кислый оптимум pH для ADA2 и необходимость в высоких концентрациях аденозина свидетельствует о том, что

ADA2 может быть активна в специфических средах, таких как очаги воспаления или опухоли, в которых концентрация аденозина повышена, а pH ниже. В опухолевом микроокружении, в опухолевых клетках может проходить интенсивный гликолиз из-за гипоксической среды, в результате чего некоторые области внеклеточного микроокружения становятся кислыми (pH 6,5-6,9).

У человека, ADA2 экспрессируется повсеместно, но большее всего у взрослых в сердце, легких, лимфобластах и плаценте, а также в легких плода, печени и почках. ADA2 также обнаруживается в плазме крови на уровне белка. Большая часть активности ADA в нормальной человеческой сыворотке или плазме приходится на ADA2 (Neidzwicki and Aberneth (1991) Biochemical Pharmacology 41:1615-1624). ADA2 секретируется активированными клетками, включая активированные моноциты и другие иммунные клетки, и, в меньшей степени, нестимулированными лимфоцитами (Iwaki-Egawa *et al.* (2006) Biol. Chem. 387:319-321). Иммунные клетки, такие как моноциты, активируются в очагах воспаления и опухолях, где накапливается внеклеточная аденозиндезаминаза (Sitkovsky *et al.* (2004) Annu. Rev. Immunol. 22:657-682). ADA2 может участвовать в регуляции уровней аденозина в этих специфических условиях (Zavialov *et al.* (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290). Например, функционирование ADA2 может приводить к снижению уровня аденозина в среде с высокой концентрацией аденозина, такой как очаги воспаления или в опухолевом микроокружении в условиях гипоксии.

Активность ADA2 повышается в плазме пациентов, страдающих заболеваниями печени, таких как хронический гепатит или цирроз, СПИД, Т-клеточный лейкоз взрослых, острый лимфобластный лейкоз, туберкулез или сахарный диабет (Zavialov *et al.* (2005) Biochem. J. 391:51-57). Кроме того, уровни ADA2 повышены в туберкулезном плевральном выпоте при недавней *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) инфекции (Valdez) или при висцеральном лейшманиозе (Tripathi *et al.*, Clinica Chimica Acta 388 (2008) 135-138). В плевральном выпоте при MTB инфекции содержится большое число макрофагов и CD4+ клеток, что указывает на то, что секреция ADA2 макрофагами может модулировать иммунный ответ в процессе MTB инфекции (Zavialov *et al.* (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290).

ADA2 связывается с клеточной поверхностью через протеогликаны GAG (*например,* гепарин) и ADR. Аналоги гепарина, такие как протеогликан, содержащий гепарансульфат (HSPG), или протеогликан, содержащий хондроитинсульфат (CS), присутствуют на клеточной поверхности и участвуют в локализации белка и клеточном сигналинге. ADA2 может связываться с различными типами клеток через эти аналоги гепарина, при этом связывание с более сульфатированным гепарансульфатом прочнее, чем связывание с менее сульфатированным гепарансульфатом, что свидетельствует о том, что в связывании задействованы сильные ионные взаимодействия. В отличие от ADA2, ADA1 не связывается с гепарином (Zavialov *et al.* (2005) Biochem. J. 391:51-57, Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377).

Помимо связывания с протеогликанами, содержащими аналоги гепарина, димер ADA2 связывается с аденозиновыми рецепторами (ADR), которые функционируют в димерной форме (Zavialov *et al.* (2005) Biochem. J. 391:51-57, Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377). Сообщается, что ADA2 взаимодействует с клетками и таким образом проявляет активность фактора роста. ADA2 также может напрямую связываться с некоторыми димерными аденозиновыми рецепторами, стимулировать пролиферацию активированных моноцитами CD4 T клеток независимо от ее каталитической активности, индуцировать зависимую от Т-клеток дифференциацию моноцитов в макрофаги и стимулировать пролиферацию макрофагов. Например, ADA2 увеличивает скорость пролиферации активированных моноцитами CD4 Т-клеток, независимо от ее каталитической активности, индуцирует зависимую от Т-клеток дифференциацию моноцитов в макрофаги, и стимулирует пролиферацию макрофагов (Zavialov *et al.* (2010) J. Leukoc. Biol. 88:279-290).

Дефекты или дефициты в ADA2 были ассоциированы с увеличенным сосудистым воспалением и васкулопатией, в частности, ассоциированы с узелковым полиартериитом или синдромом Снеддона (Zhou *et al.* (2014) N. Engl. J. Med 370:911-920; Navon Elkan *et al.* (2014) N. Engl. J. Med 370:921-931; Garg *et al.* (2014) Eur. J. Pediatr 173:827-830; Bras *et al.* (2014) New Eng. J. Med., 371:479-48; Belot *et al.*(2014) Pediatric Rheumatology 12:44). Например, васкулит ассоциирован с рецессивными мутациями в гене, кодирующем ADA2,

характеризующимся мутациями G47A, G47R, G47V, A109D, H112Q, V119A, G142S, R169Q, P193L, P251L, W264S, Y453C со ссылкой на белок-предшественник ADA2, приведенный в SEQ ID NO:2 (Navon Elkan *et al.* (2014) N. Engl. J. Med 370:921-931; Zhou *et al.* (2014) N. Engl. J. Med 370:911-920; Bras *et al.* (2014) New Eng. J. Med., 371:479-480).

2. Варианты ADA2

В настоящем документе предусмотрены варианты или мутанты ADA2, включающие полипептид, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций (т.е. изменения в аминокислотной последовательности) по сравнению с ADA2 сравнения или немодифицированной ADA2. Модификации могут быть в любом полипептиде ADA2 сравнения или немодифицированном полипептиде ADA2, при условии, что ADA2 сравнения еще не содержит аминокислотное изменение в модифицированном положении (модифицированных положениях). Например, модификация (модификации) может быть в полипептиде ADA2, который содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5 или 326-336, 338-342, 375 или 380-383, их каталитически активном фрагменте или в последовательности аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с любым из SEQ ID NO: 5 или 326-336, 338-342, 375 или 380-383 или их каталитически активным фрагментом, но не содержит модификацию (модификации).

В конкретных примерах, модификации сделаны в полипептиде ADA2, приведенном в SEQ ID NO: 5, его каталитически активном фрагменте или в последовательности аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ей каталитически активным фрагментом, но не содержит модификацию (модификации). Например, модификации могут быть в ADA2, имеющей последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383. Модификации также могут быть в каталитически активной части SEQ ID NO: 5. Например, каталитически активной ADA2 может

быть ADA2, у которой отсутствует весь PRB домен или часть PRB домена, например, приведенная в любой из SEQ ID NO: 548-550 или 579. В конкретных примерах, модификации сделаны в человеческой ADA2, содержащей последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В примерах варианта полипептида ADA2, предусмотренных в настоящем документе, вариант ADA2 не имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1, 5, 68, 286-302, 326-342 или 374-383. Также, в примерах в настоящем документе, вариант полипептида ADA2 не содержит модификации, которые представляют собой делецию R8-K14del→-- или аминокислотную замену H7R, G18A, G18R, G18V, I64T, A80D, H83Q, V90A, C108G, H121R, W133G, R140Q, K141R, P164L, P222L, W235S, H306R, E330G, W333G, V365L, Y424C, F464S, с нумерацией со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Вариант ADA2 может быть мономером или димером, например, гетеродимером или гомодимером. Варианты полипептида ADA2, приведенные в настоящем документе, обладают активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин. Понятно, что вариант полипептида ADA2 обладает такой активность, когда он находится в активной форме, например, когда существует в виде димера. Как правило, такая активность характерна для ADA2 в димерной форме. Следовательно, любые варианты, предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы для регулирования уровней аденозина в среде, в которой необходимо регулировать аденозинзависимую иммуномодуляцию или другую аденозинзависимую активность, например, в опухолевом микроокружении или при воспалении. Следовательно, любые варианты, предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы в способах лечения опухоли или рака, как описано в настоящем документе.

Находясь в активной форме, например, находясь в форме димера, вариант ADA2, содержащий вариант полипептида ADA2, может обладать примерно от 50% до 500%, например, примерно от 50% до 400%, от 50% до 300%, от 50% до 200%, от 50% до 150%, от 50% до 100%, от 50% до 80%, от 80% до 400%, от 80% до 300%, от 80% до 200%, от 80% до 150%, от 80% до 100%, от 100% до

400%, от 100% до 300%, от 100% до 200% тлт от 100% до 150% активности аденозиндезаминазы по сравнению с соответствующей формой полипептида ADA2, не содержащего модификацию (модификации) (т.е., немодифицированный ADA2), например, гомодимер ADA2, содержащий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активный фрагмент. Например, находясь в активной форме, например, находясь в форме димера, вариант ADA2, содержащий вариант полипептида ADA2, может обладать, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% или больше активности аденозиндезаминазы по сравнению с соответствующей формой полипептида ADA2, не содержащего модификацию (модификации) (т.е., немодифицированный ADA2), например, гомодимер ADA2, содержащий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активный фрагмент. Как правило, вариант ADA2, содержащий вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, находясь в форме димера, сохраняет активность аденозиндезаминазы соответствующей формы гомодимера ADA2, содержащего последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активный фрагмент, например, вариант ADA2, находясь в форме димера, обладает, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% или больше активности аденозиндезаминазы гомодимера ADA2, содержащего последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активный фрагмент.

Как правило, каталитическая эффективность или k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$) варианта ADA2, содержащего вариант полипептида ADA2, предусмотренного в настоящем документе, составляет, по меньшей мере, 5000, например, обычно составляет от или примерно от 5 x 10^3 до 5 x 10^6, от 5 x 10^3 до 2,5 x 10^6, от 5 x 10^3 до 1 x 10^6, от 5 x 10^3 до 5 x 10^5, от 5 x 10^3 до 2,5 x 10^5, от 5 x 10^3 до 1 x 10^5, от

5×10^3 до 8×10^4, от 5×10^3 до 5×10^4, от 5×10^3 до $2,5 \times 10^4$, от 5×10^3 до 1×10^4, от 1×10^4 до 5×10^5, от 1×10^4 до $2,5 \times 10^5$, от 1×10^4 до 1×10^5, от 1×10^4 до 8×10^4, от 1×10^4 до 5×10^4, от 1×10^4 до $2,5 \times 10^4$, от $2,5 \times 10^4$ до 5×10^6, от $2,5 \times 10^4$ до $2,5 \times 10^6$, от $2,5 \times 10^4$ до 1×10^6, от $2,5 \times 10^4$ до 5×10^5, от $2,5 \times 10^4$ до $2,5 \times 10^5$, от $2,5 \times 10^4$ до 1×10^5, от $2,5 \times 10^4$ до 8×10^4, от $2,5 \times 10^4$ до 5×10^4, от 5×10^4 до 5×10^6, от 5×10^4 до $2,5 \times 10^6$, от 5×10^4 до 1×10^6, от 5×10^4 до 5×10^5, от 5×10^4 до $2,5 \times 10^5$, от 5×10^4 до 1×10^5, от 5×10^4 до 8×10^4, от 8×10^4 до 5×10^6, от 8×10^4 до $2,5 \times 10^6$, от 8×10^4 до 1×10^6, от 8×10^4 до 5×10^5, от 8×10^4 до $2,5 \times 10^5$, от 8×10^4 до 1×10^5, от 1×10^5 до 5×10^6, от 1×10^5 до $2,5 \times 10^6$, от 1×10^5 до 1×10^6, от 1×10^5 до 5×10^5, от 1×10^5 до $2,5 \times 10^5$, от $2,5 \times 10^5$ до 5×10^6, от $2,5 \times 10^5$ до $2,5 \times 10^6$, от $2,5 \times 10^5$ до 1×10^6, от $2,5 \times 10^5$ до 5×10^5, от 5×10^5 до 5×10^6, от 5×10^5 до $2,5 \times 10^6$ или от 5×10^5 до 1×10^6 $M^{-1}c^{-1}$. Например, вариант ADA2, содержащий вариант полипептида ADA2, предусмотренного в настоящем документе, обладает каталитической эффективностью k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$), равной, по меньшей мере, 5×10^3, 6×10^3, 7×10^3, 8×10^3, 9×10^3, 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4, 6×10^4, 7×10^4, 8×10^4, 9×10^4, 1×10^5, 2×10^5, 3×10^5, 4×10^5, 5×10^5 или больше или 6×10^5, 7×10^5, 8×10^5, 9×10^5, 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6 $M^{-1}c^{-1}$ или больше.

Вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может содержать аминокислотные замены, добавления (т.е., вставки), делеции, укорочения или их комбинации. Вариант ADA2 может содержать модификацию (модификации) в любой области или в любом домене полипептида ADA2, при условии, что полученный вариант ADA2, когда находится в активной форме, например, в виде димера, сохраняет, по меньшей мере, активность аденозиндезаминазы. Для целей настоящего документа, ссылка на модификацию (модификации) в полипептиде ADA2 относится к остаткам зрелого полипептида ADA2, приведенного в SEQ ID NO: 5. Аминокислотные замены также могут быть сделаны в соответствующих остатках в любом полипептиде ADA2 или его каталитически активном фрагменте, в том числе в любом полипептиде ADA2 или варианте полипептида ADA2, известном в данной области техники. Соответствующие остатки могут быть идентифицированы путем выравнивания со зрелым полипептидом,

приведенным в SEQ ID NO: 5 (см., например, Фигуру 1, Таблицу 1). В этой заявке и Примерах дана ссылка на нумерацию по Zavialov (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377), которая основана на нумерации аминокислотных остатков, приведенных в SEQ ID NO:4. Смотрите таблицу 1, в которой приведены соответствующие номера положений согласно нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4) и нумерации зрелой ADA2 (SEQ ID NO: 5).

Для сохранения активности аденозиндезаминазы, модификации, как правило, сделаны не в тех положениях, которые менее устойчивы к изменениям. Такие положения могут быть в пределах доменов или областей, необходимых для каталитической активности, связывания с субстратом и/или димеризации. Например, такие положения включают области, являющиеся высоко консервативными, например, остатки, необходимые для координации цинка, или остатки активного сайта. Специалист в данной области знает или может легко идентифицировать аминокислотные остатки, которые необходимы для активности и не должны быть изменены. Также в некоторых примерах, если модификация сделана в этих положениях, это обычно консервативная аминокислотная замена. Специалисту в данной области техники понятно, что консервативные аминокислотные замены, такие как приведенные в таблице 3, могут быть использованы, чтобы снизить вероятность модификации, в результате которой снижается активность.

Варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе, могут содержать субъединицу полипептида, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью полипептида немодифицированного полипептида ADA2 или полипептида ADA2 сравнения, например, приведенного в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или ее каталитически активный фрагмент. В частности, варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе, содержат субъединицу полипептида, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью полипептида, приведенной в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активным фрагментом. Варианты белка ADA2,

предусмотренные в настоящем документе, могут содержать субъединицу полипептида, которая может содержать, по меньшей мере, или примерно или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или больше аминокислотных модификаций по сравнению с последовательностью полипептида немодифицированного полипептида ADA2 или полипептида ADA2 сравнения. Понятно, что, находясь, в форме димера или мультимера, вариант ADA2 может содержать, по меньшей мере, или примерно или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 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 или больше аминокислотных модификаций.

Для целей настоящего документа, обозначение аминокислотной замены включает указание замещенной аминокислоты, аминокислотного положения и замещающей аминокислоты (*например,* K11A согласно нумерации зрелой формы означает, что аминокислота в положении, соответствующем аминокислотному остатку 11 в SEQ ID NO: 5, *например,* лизину, замещена на аланин). Для целей настоящего документа, обозначение аминокислотной замены включает указание замещенной аминокислоты, аминокислотного положения и замещающей аминокислоты (*например,* K14A согласно нумерации по Zavialov означает, что аминокислота в положении, соответствующем аминокислотному остатку 14 в SEQ ID NO:4, *например,* лизину, замещена на аланин). Смотрите таблицу 1, в которой приведены соответствующие номера положений согласно нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4) и нумерации зрелого ADA2 (SEQ ID NO: 5). Номенклатура также используется в настоящем документе для обозначения вставок (---→ с последующим обозначением положения вставки) или делеций (*например,* положение делеции (del) с последующим написанием →--) аминокислотного остатка в соответствующем положении в SEQ ID NO: 5, согласно нумерации зрелой формы, и/или в SEQ ID NO:4, согласно нумерации по Zavialov. Например, ---→N1 согласно нумерации зрелой формы означает, что остаток в положении 1 вставлен по сравнению с соответствующей

последовательностью зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5. Например, --→N4 согласно нумерации по Zavialov означает, что остаток в положении 4 вставлен по сравнению с соответствующей последовательностью ADA2, приведенной в SEQ ID NO:4. Понятно, что в некоторых случаях, из-за делеций или вставок аминокислотных остатков, нумерация остатков в варианте полипептида ADA2 изменена по сравнению с нумерацией остатков, приведенных в SEQ ID NO: 5. В таких примерах, специалист в данной области техники способен идентифицировать остатки в соответствующем варианте полипептида ADA2, которые соответствуют остаткам в SEQ ID NO: 5, например, путем выравнивания, как это продемонстрировано на Фигуре 1. Например, нумерация остатков в варианте полипептида ADA2 может быть сделана на основе нумерации по Zavialov (Zavialov *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285:12367-12377), которая основана на нумерации аминокислотных остатков, приведенных в SEQ ID NO:4. Смотрите таблицу 1, в которой приведены соответствующие номера положений согласно нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4) и нумерации зрелого ADA2 (SEQ ID NO: 5).

Примеры модификаций в варианте полипептида ADA2, предусмотренные в настоящем документе, более подробно описаны ниже. Вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, включает те, которые, когда находятся в активной форме, обладают измененной или улучшенной активностью или свойствами по сравнению с соответствующей формой ADA2 сравнения или ADA2 дикого типа, не содержащей модификацию (модификации) (т.е., немодифицированный ADA2). Например, вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, включает те варианты, которые, когда находятся в активной форме, обладают измененными или улучшенными активностями или свойствами по сравнению с соответствующей формой немодифицированной ADA2, содержащей полипептид ADA2, имеющий последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ее каталитически активным фрагментом, например, приведенные в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или их каталитически активные фрагменты. В частности, модификации, предусмотренные в настоящем документе, могут

влиять на любую одну или несколько активностей, выбранных из увеличенной активности аденозиндезаминазы, ослабленного связывания с гепарином, увеличенного времени полужизни, измененного оптимума pH, увеличенной термостабильности, пониженного связывания с рецепторами или гипергликозилирования по сравнению с соответствующей формой ADA2, не содержащей модификации (т.е., немодифицированная ADA2).

В частности, активная форма представляет собой димерную форму, например, форму гомодимера, которая содержит вариант полипептида ADA2. Таким образом, в примерах в настоящем документе, варианты белка ADA2, содержащие вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, когда находятся в форме димера, обладают измененными или улучшенными активностями или свойствами по сравнению с соответствующей димерной формой ADA2 сравнения или ADA2 дикого типа, не содержащего модификации. Например, вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, включает те варианты, которые, когда находятся в форме димера, обладают измененными или улучшенными активностями или свойствами по сравнению с соответствующей димерной формой немодифицированного ADA2, содержащей полипептид ADA1, имеющий последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ее каталитически активным фрагментом, например, приведенными в любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или 380-383, или их каталитически активными частями. Например, в настоящем документе предусмотрен вариант ADA2, содержащий вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, который, когда находится в форме димера, обладает измененными или улучшенными активностями или свойствами по сравнению с гомодимером ADA2, содержащем последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5 или ее каталитически активным фрагментом. В частности, приведенные в настоящем документе модификации могут влиять на любую одну или несколько активностей, выбранных из увеличенной активности аденозиндезаминазы, ослабленного связывания с гепарином, увеличенного времени полужизни, измененного оптимума pH, увеличенной термостабильности, пониженного связывания с рецепторами или гипергликозилирования по сравнению с

соответствующей формой ADA2, не содержащей модификации (т.е., немодифицированная ADA2).

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, например, в форме димера, обладают увеличенной активностью аденозиндезаминазы. Например, вариант белка ADA2, когда находится в активной форме, такой как форма димера, может обладать, по меньшей мере, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или больше активности соответствующей формы немодифицированной ADA2, при этом активность аденозиндезаминазы оценивается в одни и тех же условиях. Каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) варианта ADA2, который обладает увеличенной активностью аденозиндезаминазы, больше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 2,2 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз или больше, или в 11,0 раз, 12,0 раз, 13,0 раз, 14,0 раз, 15,0 раз или больше, чем каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) соответствующей формы немодифицированной ADA2, при этом каталитическая эффективность активности аденозиндезаминазы оценивается в одних и тех же условиях. Например, находясь в форме димера, вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, обладает каталитической эффективностью (k_{cat}/K_M), которая составляет, по меньшей мере, 2×10^4 M^{-1} c^{-1}, 3×10^4 M^{-1} c^{-1}, 4×10^4 M^{-1} c^{-1}, 5×10^4 M^{-1} c^{-1}, 6×10^4 M^{-1} c^{-1}, 7×10^4 M^{-1} c^{-1}, 8×10^4 M^{-1} c^{-1}, 9×10^4 M^{-1} c^{-1}, 1×10^5 M^{-1} c^{-1}, 2×10^5 M^{-1} c^{-1}, 3×10^5 M^{-1} c^{-1}, 4×10^5 M^{-1} c^{-1}, 5×10^5 $M^{-1}c^{-1}$ или больше, или 6×10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 7×10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 8×10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 9×10^5 $M^{-1}c^{-1}$, 1×10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 2×10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 3×10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 4×10^6 $M^{-1}c^{-1}$, 5×10^6 $M^{-1}c^{-1}$ или больше.

В примерах в настоящем документе, в настоящем документе предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, например, в форме димера, обладают пониженным связыванием с любым одним или несколькими аденозиновыми рецепторами (ADR), выбранными из A_1, A_{2A}, A_{2B} и A_3, и, как правило, с одним или обоими A_{2A} или

A_{2B}. Не основываясь на какой-либо теории, в настоящем документе предполагается, что активность аденозиндезаминазы, предусмотренная в настоящем документе, заключающаяся в превращении аденозина в инозин, выше или более эффективна, если связывание ADA2 с ADR снижено. Например, в настоящем документе предусмотрены варианты ADA2, для которых, когда они находятся в активной форме, например, в форме димера, связывание с одним или несколькими ADR снижено, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно в 0,5 раз, 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или больше по сравнению с соответствующей формой немодифицированной ADA2.

В примерах в настоящем документе, в настоящем документе предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, например, в форме димера, обладают пониженными или ослабленными связыванием с гепарином. ADA2 связывается с гликозаминогликанами (GAG), включая гепарин и его аналоги, такие как гепарансульфат и хондроитинсульфат. Высокоаффинное связывание с гепарином/GAG обусловлено большой, сильно положительно заряженной поверхностью на границе раздела димера, при этом в результате димеризации ADA2 образуется сайт связывания с гепарином. Поскольку гликозаминогликаны широко распространены в организме, они могут взаимодействовать с введенной ADA2 и задерживать ее на периферии. Поэтому, ADA2 с пониженным связыванием с гепарином может увеличить биодоступность и фармакокинетику введенной ADA2. Например, варианты ADA2 с ослабленным связыванием с гепарином, предусмотренные в настоящем документе, имеют улучшенную биосовместимость и фармакокинетику, например, увеличенное время полужизни после введения, поскольку введенные молекулы ADA2 не будут задерживаться на периферии за счет связывания с GAG. В частности, в настоящем документе предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, например, в форме димера, обладают не более, чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от связывания с гепарином соответствующей формы немодифицированной ADA2, при этом связывание гепарина оценивается в одних и тех же условиях.

В примерах в настоящем документе, предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, такой как димерная форма, обладают увеличенным или более продолжительным временем полужизни в плазме или сыворотке ($t_{1/2}$). Например, вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, когда находится в активной форме, например, в форме димера, имеет время полужизни, которое длиннее, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно на 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% или больше, или длиннее на 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000%, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% или больше, чем время полужизни соответствующей формы немодифицированной ADA2, при этом время полужизни оценивается в одних и тех же условиях.

В примерах в настоящем документе, предусмотрены варианты белка ADA2, которые, когда находятся в активной форме, например, в форме димера, обладают увеличенной термостабильностью. Например, находясь в активной форме, например, в форме димера, вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, обладает термостабильностью с температурой плавления (Tm), которая выше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно на 0,5°C, 1,0°C, 2,0°C, 3,0°C, 4,0°C, 5,0°C, 6,0°C, 7,0°C, 8,0°C, 9,0°C, 10,0°C или больше, чем Tm соответствующей формы немодифицированной ADA2, при этом Tm оценивается в одних и тех же условиях. Температура плавления (Tm) варианта ADA2, когда он находится в активной форме, например, в форме димера, предусмотренной в настоящем документе, может составлять, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 67,6°C, 67,8°C, 68,0°C, 68,2°C, 68,4°C, 68,6°C, 68,8°C, 69,0°C, 69,2°C, 69,4°C, 69,6°C, 69,8°C, 70,0°C, 70,2°C, 70,4°C, 70,6°C, 70,8°C, 71,0°C, 71,2°C, 71,4°C, 71,6°C, 71,8°C или выше.

В примерах в настоящем документе, ADA2 или ее вариант могут проявлять активность аденозиндезаминазы в оптимуме pH от или примерно от pH 6,0 до pH 7,6, например при pH, равном, по меньшей мере, 6, 6.25, 6.5, 6,75, 7, 7,25 или 7,5. Например, ADA2 имеет оптимум pH, равный или примерно равный pH 6,5 ± 0,2. Варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем

документе, имеют оптимум pH для активности аденозиндезаминазы, от или примерно от pH 6,0 до 6,8, например, равный или примерно равный pH 6,5 ± 0,2. В некоторых случаях, вариант ADA2 имеет измененный оптимум pH и может проявлять каталитическую активность при более высоком pH, от или примерно от pH 6,8 до pH 7,6, например, от или примерно от pH 7,0 до pH 7,5 или от pH 7,2 до pH 7,4, включительно. Поскольку пролиферирующая ткань вблизи кровеносных сосудов в TME может иметь более нейтральный pH, такие варианты могут быть более активными в конкретном опухолевом окружении. Например, вариант ADA2 может иметь оптимум pH для активности аденозиндезаминазы, равный, по меньшей мере, pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 или выше.

Основываясь на этом описании, специалист в данной области техники может создать вариант ADA2, содержащий любую одну или несколько из описанных модификаций, и протестировать каждый созданный вариант на активность аденозиндезаминазы и/или одно или несколько свойств, выбранных из связывания с гепарином, времени полужизни, оптимума pH, термостабильности, связывания с рецептором и/или гликозилирования, как описано в настоящем документе.

a. Примеры модификаций

i. Аминокислотные замены

В одном из примеров, модификация (модификации) могут представлять собой аминокислотную замену (аминокислотные замены). В настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2 в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному остатку 11, 13, 20, 22, 26, 86, 109, 118, 119, 124, 133, 139, 179, 183, 191, 217, 219, 221, 224, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, аминокислотная замена может быть в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному остатку K11, K13, R20, V22, K26, D86, F109, R118, F119, P124, W133, Y139, E179, F183, Y191, R217, R219, L221, Y224,

K258, S262, H264, S266, K267, R277, R283, V296, K309, K317, K321, R352, R366, K371, K372, D373, I374, T403, G404, H405, P406, R441, K444, K452, K461, K469 или K470, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2, представляющие собой любую одну или несколько аминокислотных замен из: K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, R20A, R20D, R20E, R20N, V22S, K26A, K26D, K26E, D86A, D86C, D86E, D86F, D86G, D86H, D86I, D86K, D86L, D86M, D86N, D86P, D86Q, D86R, D86S, D86T, D86V, D86W, D86Y, F109S, F109A, R118D, R118A, F119S, F119K, P124A, P124S, W133S, W133T, Y139T, Y139A, E179A, E179C, E179D, E179F, E179G, E179H, E179I, E179K, E179L, E179M, E179N, E179P, E179Q, E179R, E179S, E179T, E179V, E179W, E179Y, F183K, Y191S, Y191D, R217A, R217D, R217E, R219A, R219C, R219D, R219E, R219F, R219G, R219H, R219I, R219K, R219L, R219M, R219N, R219P, R219Q, R219S, R219T, R219V, R219W, R219Y, L221A, L221C, L221D, L221E, L221F, L221G, L221H, L221I, L221K, L221M, L221N, L221P, L221Q, L221R, L221S, L221T, L221V, L221W, L221Y, Y224R, Y224N, K258A, K258D, K258E, S262A, S262C, S262D, S262E, S262F, S262G, S262H, S262I, S262K, S262L, S262M, S262N, S262P, S262Q, S262R, S262T, S262V, S262W, S262Y, H264A, H264C, H264D, H264E, H264F, H264G, H264I, H264K, H264L, H264M, H264N, H264P, H264Q, H264R, H264S, H264T, H264V, H264W, H264Y, S266A, S266C, S266D, S266E, S266F, S266G, S266H, S266I, S266K, S266L, S266M, S266N, S266P, S266Q, S266R, S266T, S266V, S266W, S266Y, K267A, K267C, K267D, K267E, K267F, K267G, K267H, K267I, K267L, K267M, K267N, K267P, K267Q, K267R, K267S, K267T, K267V, K267W, K267Y, R277A, R277D, R277E, R283A, R283D, R283E, V296A, V296C, V296D, V296E, V296F, V296G, V296H, V296I, V296K, V296L, V296M, V296N, V296P, V296Q, V296R, V296S, V296T, V296W, V296Y, K309A, K309D, K309E, K317A, K317D, K317E, K321A, K321D, K321E, R352A, R352D, R352E, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K371N, K372A, K372D, K372E, K372N, D373S, I374S, T403N, G404N, H405S, P406S, R441A, R441D, R441E, K444A, K444D, K444E, K452A, K452D, K452E,

K461A, K461D, K461E, K469A, K469D, K469E, K470A, K470D и K470E, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В частности, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2, которые представляют собой любую одну или несколько аминокислотных замен из: K11A, K11E, R20A, R20D, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E и K452E, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2, которые представляют собой любую одну или несколько аминокислотных замен из: K11A, K11E, R20A, R20E, R219K, R219Q, L221A, L221V, L221G, S262N, H264Q, H264G, R366E, K371A, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D и K452E, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. В другом примере, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2, представляющие собой любую одну или несколько аминокислотных замен из R20A, R20D, R20E, S262N, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E и K452E, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. В примерах, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2, представляющие собой любую одну или несколько аминокислотных замен из K11A, R20A, R20E, R219Q, S262N, K371A, K371D или K371E, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с полипептидом ADA2 сравнения,

не содержащим модификации (т.е., немодифицированная ADA2). Варианты полипептида ADA2 могут содержать любые две или больше аминокислотных замен, предусмотренных выше, при условии, что полученный вариант ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы или сохраняет активность аденозиндезаминазы. Две или больше аминокислотных замен могут приводить к такой же измененной активности или к другой измененной активности. Например, одна аминокислотная замена может приводить к измененному связыванию с гепарином, а другая аминокислотная замена может приводить к увеличенной активности аденозиндезаминазы. Следовательно, полученные варианты полипептида ADA2 обладают двумя или несколькими измененными активностями или свойствами.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат аминокислотные замены K11A/R20A; K11A/R20A/K371A; R20A/K371A; K11A/K371A; S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; или R219Q/S262N, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат аминокислотные замены K11A/R20A; K11A/R20A/K371A; R20A/K371A; K11A/K371A; S262N/K371D; S262N/K371E; S262N/R20E; S262N/R20E/K371D; S262N/R20E/K371E; R219Q/K371E; R219Q/K371D; R219Q/R20E; R219Q/K371E/R20E; R219Q/K371D/R20E; R219Q/S262N/K371E; R219Q/S262N/K371D; R219Q/S262N/R20E; R219Q/S262N/K371E/R20E; R219Q/S262N/K371D/R20E; или R219Q/S262N, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO: 13-63 или 71-273, или их каталитически активная часть.

В других примерах, также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат аминокислотные замены R219Q/S262N/K11A; R219Q/S262N/K11D; R219Q/S262N/K11E; R219Q/S262N/K13A; R219Q/S262N/K13D; R219Q/S262N/K13E; R219Q/S262N/K371A; R219Q/S262N/K372A; R219Q/S262N/K372D; R219Q/S262N/K372E; R219Q/S262N/K452A; R219Q/S262N/K452D; R219Q/S262N/K452E; R219Q/S262N/R20A; R219Q/S262N/R20D; R219Q/S262N/R366A; R219Q/S262N/R366D; R219Q/S262N/R366E; R219Q/S262N/H264A; R219Q/S262N/H264Q; R219Q/S262N/H264N; R219Q/S262N/H264G; R219K/S262N; R219N/S262N; R219A/S262N; R219Q/S262N/L221A; R219Q/S262N/L221V; R219Q/S262N/L221G; R219Q/S262N/E179D; R219Q/S262N/E179A; R219Q/S262N/E179S; R219Q/S262N/E179T; R219Q/S262N/E179V; R219Q/S262N/E179G; R219Q/S262A; R219Q/S262V; R219Q/S262M; R219Q/S262N/K11A/R20A; R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A; R219Q/S262N/R20A/K371A; R219Q/S262N/K11A/K371A; R219Q/S262N/K26A; R219Q/S262N/K26D; R219Q/S262N/K26E; R219Q/S262N/R217A; R219Q/S262N/R217D; R219Q/S262N/R217E; R219Q/S262N/K258A; R219Q/S262N/K258D; R219Q/S262N/K258E; R219Q/S262N/R277A; R219Q/S262N/R277D; R219Q/S262N/R277E; R219Q/S262N/R283A; R219Q/S262N/R283D; R219Q/S262N/R283E; R219Q/S262N/K309A; R219Q/S262N/K309D; R219Q/S262N/K309E; R219Q/S262N/K317A; R219Q/S262N/K317D; R219Q/S262N/K317E; R219Q/S262N/K321A; R219Q/S262N/K321D; R219Q/S262N/K321E; R219Q/S262N/R352A; R219Q/S262N/R352D; R219Q/S262N/R352E; R219Q/S262N/R441A; R219Q/S262N/R441D; R219Q/S262N/R441E; R219Q/S262N/K444A; R219Q/S262N/K444D; R219Q/S262N/K444E; R219Q/S262N/K461A; R219Q/S262N/K461D; R219Q/S262N/K461E; R219Q/S262N/K469A; R219Q/S262N/K469D; R219Q/S262N/K469E; R219Q/S262N/K470A; R219Q/S262N/K470D; R219Q/S262N/K470E; R219Q/S262N/D86A; R219Q/S262N/D86C; R219Q/S262N/D86E; R219Q/S262N/D86F; R219Q/S262N/D86G; R219Q/S262N/D86H; R219Q/S262N/D86I; R219Q/S262N/D86K;

R219Q/S262N/D86L; R219Q/S262N/D86M; R219Q/S262N/D86N;
R219Q/S262N/D86P; R219Q/S262N/D86Q; R219Q/S262N/D86R;
R219Q/S262N/D86S; R219Q/S262N/D86T; R219Q/S262N/D86V;
R219Q/S262N/D86W; R219Q/S262N/D86Y; R219Q/S262N/E179C;
R219Q/S262N/E179F; R219Q/S262N/E179H; R219Q/S262N/E179I;
R219Q/S262N/E179K; R219Q/S262N/E179L; R219Q/S262N/E179M;
R219Q/S262N/E179N; R219Q/S262N/E179P; R219Q/S262N/E179Q;
R219Q/S262N/E179R; R219Q/S262N/E179W; R219Q/S262N/E179Y;
R219C/S262N; R219D/S262N; R219E/S262N; R219F/S262N; R219G/S262N;
R219H/S262N; R219I/S262N; R219L/S262N; R219M/S262N; R219P/S262N;
R219S/S262N; R219T/S262N; R219V/S262N; R219W/S262N; R219Y/S262N;
R219Q/S262N/L221C; R219Q/S262N/L221D; R219Q/S262N/L221E;
R219Q/S262N/L221F; R219Q/S262N/L221H; R219Q/S262N/L221I;
R219Q/S262N/L221K; R219Q/S262N/L221M; R219Q/S262N/L221N;
R219Q/S262N/L221P; R219Q/S262N/L221Q; R219Q/S262N/L221R;
R219Q/S262N/L221S; R219Q/S262N/L221T; R219Q/S262N/L221W;
R219Q/S262N/L221Y; R219Q/S262C; R219Q/S262D; R219Q/S262E;
R219Q/S262F; R219Q/S262G; R219Q/S262H; R219Q/S262I; R219Q/S262K;
R219Q/S262L; R219Q/S262P; R219Q/S262Q; R219Q/S262R; R219Q/S262T;
R219Q/S262W; R219Q/S262Y; R219Q/S262N/H264C; R219Q/S262N/H264D;
R219Q/S262N/H264E; R219Q/S262N/H264F; R219Q/S262N/H264I;
R219Q/S262N/H264K; R219Q/S262N/H264L; R219Q/S262N/H264M;
R219Q/S262N/H264P; R219Q/S262N/H264R; R219Q/S262N/H264S;
R219Q/S262N/H264T; R219Q/S262N/H264V; R219Q/S262N/H264W;
R219Q/S262N/H264Y; R219Q/S262N/S266A; R219Q/S262N/S266C;
R219Q/S262N/S266D; R219Q/S262N/S266E; R219Q/S262N/S266F;
R219Q/S262N/S266G; R219Q/S262N/S266H; R219Q/S262N/S266I;
R219Q/S262N/S266K; R219Q/S262N/S266L; R219Q/S262N/S266M;
R219Q/S262N/S266N; R219Q/S262N/S266P; R219Q/S262N/S266Q;
R219Q/S262N/S266R; R219Q/S262N/S266T; R219Q/S262N/S266V;
R219Q/S262N/S266W; R219Q/S262N/S266Y; R219Q/S262N/K267A;
R219Q/S262N/K267C; R219Q/S262N/K267D; R219Q/S262N/K267E;

R219Q/S262N/K267F; R219Q/S262N/K267G; R219Q/S262N/K267H; R219Q/S262N/K267I; R219Q/S262N/K267L; R219Q/S262N/K267M; R219Q/S262N/K267N; R219Q/S262N/K267P; R219Q/S262N/K267Q; R219Q/S262N/K267R; R219Q/S262N/K267S; R219Q/S262N/K267T; R219Q/S262N/K267V; R219Q/S262N/K267W; R219Q/S262N/K267Y; R219Q/S262N/V296A; R219Q/S262N/V296C; R219Q/S262N/V296D; R219Q/S262N/V296E; R219Q/S262N/V296F; R219Q/S262N/V296G; R219Q/S262N/V296H; R219Q/S262N/V296I; R219Q/S262N/V296K; R219Q/S262N/V296L; R219Q/S262N/V296M; R219Q/S262N/V296N; R219Q/S262N/V296P; R219Q/S262N/V296Q; R219Q/S262N/V296R; R219Q/S262N/V296S; R219Q/S262N/V296T; R219Q/S262N/V296W; R219Q/S262N/V296Y; R219Q/K11A/R20A; R219Q/K11A/R20A/K371A; R219Q/R20A/K371A; R219Q/K11A/K371A; S262N/K11A/R20A; S262N/K11A/R20A/K371A; S262N/R20A/K371A; или S262N/K11A/K371A, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO:659-663 или 682-917, или их каталитически активная часть.

ii. Модификация (модификации) PRB домена

В других примерах, также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды ADA2, которые содержат модифицированный PRB домен. PRB домен не нужен для каталитической активности, и, следовательно, как показано в настоящем документе, может быть удален, в результате чего активности вариантов белка ADA2, отличные от дезаминазной активности, опосредованные ADA2, снижаются или элиминируются. В соответствии с опубликованной доменной организацией ADA2, PRB домен соответствует остаткам 98-156 или 105-148 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5. Модификации PRB домена могут включать делецию всего PRB домена или части PRB домена (т.е., делецию одного или нескольких остатков PRB домена), вставку одного или нескольких аминокислотных остатков в PRB домене, аминокислотную замену одного или нескольких остатков PRB домена

или их комбинацию с целью снижения или ингибирования связывания домена с рецептором или другой его активности. Например, PRB домен может содержать до или примерно до или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59 модифицированных положений, например, обычно до или примерно до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44 модифицированных положений.

В одном из примеров, как более подробно описано ниже, PRB домен целиком или часть PRB домена могут быть удалены, например, путем делеции одного или нескольких непрерывных аминокислотных остатков PRB домена. Например, в настоящем документе предусмотрен вариант ADA2, в котором удалены один или несколько непрерывных аминокислотных остатков между или примерно между аминокислотными остатками 98 и 156 или аминокислотными остатками 105 и 148 или аминокислотными остатками 105 и 147 или аминокислотными остатками 99 и 144, включительно, со ссылкой на остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Примерами таких полипептидов ADA2 являются полипептиды ADA2 с делецией непрерывных аминокислотных остатков, соответствующих непрерывным остаткам 98-156, 105-148, 105-147, 102-147 или 108-150, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5. Например, примеры таких полипептидов ADA2 включают полипептиды ADA2_del98-156 (98-156del; SEQ ID NO: 548); ADA2_del105-148 (105-148del; SEQ ID NO: 549); ADA2_del105-147 (105-147del; SEQ ID NO: 550); и ADA2_del99-144 (99-144del; SEQ ID NO: 579), согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых примерах, вариант ADA2, который содержит модификацию в PRB домене, такую как делеция непрерывных остатков, также содержит замену модифицированной или удаленной области на пептидный линкер. В результате, PRB домен целиком или часть PRB домена может быть замещена на стерически приемлемую последовательность пептидного линкера. В таких

примерах, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или больше непрерывных аминокислот из PRB домена могут быть заменены или замещены на аминокислоты пептидного линкера, длина которого обычно не превышает 60 аминокислот, и обычно не превышает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Может быть выбран любой подходящий линкер, при условии, что полученный вариант ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы.

Примеры пептидных линкеров включают: (Gly)n, где n представляет собой число от 2 до 20 (SEQ ID NO:368); —Gly-Gly—; GGG (SEQ ID NO:369); GGGG (SEQ ID NO:362); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372); GGGGS или (GGGGS)n (SEQ ID NO:343); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 580); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367); SSSSG or (SSSSG)n (SEQ ID NO:344); GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345); GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346); GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347); GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348); EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349); или AlaAlaProAla или (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), где n представляет собой число от 1 до 6, например, 1, 2, 3 или 4. В конкретных примерах, пептидный линкер представляет собой GGG (SEQ ID NO:369); GGGGG (SEQ ID NO:360); GGGGGGG (SEQ ID NO:370); GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:371); GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:372); GGGGS (SEQ ID NO:343); GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 580); или GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367), но не ограничиваясь этим.

Примером такой модификации является вариант ADA2, обозначенный C105-T147del→$(Gly)_n$ (SEQ ID NO:280), где n представляет собой число от 2 до 20, в котором PRB домен в области, соответствующей остаткам 105-147 со ссылкой на нумерацию в SEQ ID NO: 5, замещен на глициновый линкер длиной от 2 до 20 аминокислотных остатков. Например, вариантом ADA2 может быть C105-T147del→$(Gly)_{15}$ (SEQ ID NO:281); C105-T147del→$(Gly)_{10}$ (SEQ ID NO:282); C105-T147del→$(Gly)_7$ (SEQ ID NO:283); C105-T147del→$(Gly)_5$ (SEQ ID

NO:284) или C105-T147del→$(Gly)_3$ (SEQ ID NO:285). Другими примерами такой модификации является вариант ADA, обозначенный V99-Q144del→$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 581), где n представляет собой число от 1 до 5, в котором PRB домен в области, соответствующей остаткам 99-144 со ссылкой на нумерацию в SEQ ID NO: 5, замещен на $(GGGGS)_n$ линкер, где последовательность аминокислот в линкере повторяется от 1 до 5 раз, например, на линкер длиной 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. Например, вариантом ADA2 может быть V99-Q144del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 583); V99-Q144del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 584); или V99-Q144del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 585). Другим примером такой модификации является вариант ADA, обозначенный C105-T147del→$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 582), где n представляет собой число от 1 до 5, в котором PRB домен в области, соответствующей остаткам 105-147 со ссылкой на нумерацию в SEQ ID NO: 5, замещен на $(GGGGS)_n$ линкер, где последовательность аминокислот в линкере повторяется от 1 до 5 раз, например, на линкер длиной 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. Например, вариантом ADA2 может быть C105-T147del→$(GGGGS)_1$ (SEQ ID NO: 586); C105-T147del→$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 587); или C105-T147del→$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 588), согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5. Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO:281-285 и 583-588, или их каталитически активная часть.

Также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат делеции, вставки, замены и/или аминокислотные замены в PRB домене, в сочетании с другими делециями, вставками, заменами и/или аминокислотными заменами, предусмотренными в настоящем документе. Например, предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат делецию всего PRB домена или части PRB домена, например, делецию одного или нескольких непрерывных аминокислотных остатков PRB домена, в сочетании с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительными аминокислотными заменами по сравнению с немодифицированной ADA2 сравнения. Также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат модификацию

в PRB домене, такую как делеция непрерывных остатков, и также содержат замену модифицированной или удаленной области на пептидный линкер, в сочетании с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительными аминокислотными заменами по сравнению с немодифицированной ADA2 сравнения. Например, варианты полипептида ADA2, которые содержат как делецию всего PRB домена или части PRB домена, так и любую одну или несколько аминокислотных замен, предусмотренных выше, при условии, что полученный вариант ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы или сохраняет активность аденозиндезаминазы. Делеция и/или аминокислотные замены могут приводить к такой же измененной активности или к другой измененной активности. Например, делеция и/или замена PRB домена может приводить к измененной активности, например, к снижению связывания с рецептором, а аминокислотная замена (аминокислотные замены) может приводить к увеличенной активности аденозиндезаминазы. Следовательно, полученные варианты полипептида ADA2 обладают двумя или более измененными активностями или свойствами.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат следующие комбинации делеций и/или замен и/или аминокислотных замен: K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$;

K371D/C105-T147del→(Gly)n (где n представляет собой число от 2 до 20); K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); K371D/C105-T147del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); K371D/N98-N156del; K371D/C105-E148del; K371D/C105-T147del; K371D/V99-Q144del; R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n (где n представляет собой число от 2 до 20); R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/S262N/N98-N156del; R219Q/S262N/C105-E148del; R219Q/S262N/C105-T147del; R219Q/S262N/V99-Q144del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n (где n представляет собой число от 2 до 20); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/S262N/K371D/N98-N156del; R219Q/S262N/K371D/C105-E148del; R219Q/S262N/K371D/C105-T147del; R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del; R219Q/C105-T147del→(Gly)n (где n представляет собой число от 2 до 20); R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); R219Q/N98-N156del; R219Q/C105-E148del; R219Q/C105-T147del; R219Q/V99-Q144del; S262N/C105-T147del→(Gly)n (где n представляет собой число от 2 до 20); S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); S262N/C105-T147del→(GGGGS)n (где n представляет собой число от 1 до 5); S262N/N98-N156del; S262N/C105-E148del; S262N/C105-T147del; и S262N/V99-Q144del, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO: 589-594, 602-606, 634-658, 664-681, 918-931, или их каталитически активная часть.

iii. Аминокислотная замена (аминокислотные замены) с измененным взаимодействием между PRB доменом и другими областями ADA2

В еще одном другом примере, также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды ADA2, содержащие аминокислотные замены, которые приводят к измененному взаимодействию между PRB доменом и оставшейся частью ADA2 (например, аденозиндезаминазным (ADA) доменом). Например, в соответствии с опубликованной доменной организацией ADA2, PRB домен соответствует остаткам 98-156 или 105-148 зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5. В настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2 в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному остатку 109, 118, 119, 124, 133, 139, 183, 191 или 224, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, аминокислотная замена может быть в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному остатку F109, R118, F119, P124, W133, Y139, F183, Y191 или Y224 со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Модификации в каждом положении или их комбинации могут изменять взаимодействие между PRB доменом и другими доменами в ADA2, например, ADA доменом.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен в полипептиде ADA2 которые представляют собой любую одну или несколько аминокислотных замен из: F109S, F109A, R118D, R118A, F119S, F119K, P124A, P124S, W133S, W133T, Y139T, Y139A, F183K, Y191S, Y191D, Y224R или Y224N, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, содержащие аминокислотные замены, которые приводят к измененному взаимодействию между PRB доменом и оставшейся частью ADA2, в сочетании с другими делециями, вставками, заменами и/или аминокислотными заменами, предусмотренными в настоящем документе. Например, предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с полипептидом ADA2 сравнения, не содержащим модификации (т.е., немодифицированная ADA2). Варианты полипептида ADA2 могут содержать любые две или больше аминокислотных замен, предусмотренных в настоящем документе, при условии, что полученный вариант ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы или сохраняет активность аденозиндезаминазы. Две или более аминокислотных замен могут приводить к такой же измененной активности или к другой измененной активности. Например, одна аминокислотная замена может приводить к измененному взаимодействию между PRB доменом и ADA доменом, а другая может приводить к увеличенной активности аденозиндезаминазы. Следовательно, полученные варианты полипептида ADA2 обладают двумя или более измененными активностями или свойствами.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат аминокислотные замены Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F119S; R219Q/S262N/F119K; R219Q/S262N/Y224R; R219Q/S262N/Y224N; R219Q/S262N/Y191S; R219Q/S262N/Y191D; R219Q/S262N/F183K; R219Q/S262N/Y191D/Y224R; R219Q/S262N/F109S; R219Q/S262N/F109A; R219Q/S262N/R118D; R219Q/S262N/R118A; R219Q/S262N/Y139T; R219Q/S262N/Y139A; R219Q/S262N/W133S; R219Q/S262N/W133T; R219Q/S262N/P124A; или R219Q/S262N/P124S, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO: 561-578 или 616-633, или их каталитически активная часть.

iv. Гипергликозилирование

Среди вариантов ADA2 в настоящем документе предусмотрены варианты, которые были модифицированы за счет изменения уровня и/или типа гликозилирования по сравнению с немодифицированной ADA2. Гликозилирование может быть увеличено или уменьшено по сравнению с немодифицированным полипептидом ADA2. В некоторых случаях, уровень или степень гликозилирования увеличены, в результате чего получается гипергликозилированный полипептид или белок ADA2. Это может быть достигнуто, например, за счет введения, по меньшей мере, одного не нативного сайта гликозилирования, не встречающегося в немодифицированном полипептиде или белке ADA2, с которым связывается углевод. Гипергликозилированные полипептиды ADA2 также могут быть получены путем связывания углеводного фрагмента с, по меньшей мере, одним нативным сайтом гликозилирования, встречающимся в немодифицированном полипептиде ADA2, но не являющимся гликозилированным.

Варианты белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе, могут иметь измененное, например, новое, O-связанное гликозилирование, N-связанное гликозилирование или O-связанное и N-связанное гликозилирование. В некоторых примерах, вариант ADA2 включает 1, 2, 3, 4, 5 или больше углеводных фрагментов, каждый из которых связан с разными сайтами гликозилирования. Сайт гликозилирования (сайты гликозилирования) могут представлять собой нативный сайт гликозилирования (сайты гликозилирования) и/или не нативный сайт гликозилирования (сайты гликозилирования). В некоторых примерах, вариант ADA2 гликозилирован по нескольким не нативным сайтам гликозилирования. Например, вариант ADA2 может быть модифицирован таким образом, чтобы включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше не нативных сайтов гликозилирования.

Не нативные сайты гликозилирования могут быть введены путем аминокислотной замены. Сайты O-гликозилирования могут быть созданы, например, за счет аминокислотной замены нативного остатка на серин или треонин. Сайты N-связанного гликозилирования могут быть созданы за счет создания мотива Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, где Xaa не является пролином. Создание

этой консенсусной последовательности за счет аминокислотной модификации может включать замену нативного аминокислотного остатка на аспарагин, замену нативного аминокислотного остатка на серин, треонин или цистеин, или замену нативного аминокислотного остатка на аспарагин и аминокислотную замену нативного остатка на серин, треонин или цистеин. Не нативные сайты гликозилирования могут быть созданы в любой области в полипептиде ADA2. Уровень гликозилирования (*например,* число введенных не нативных сайтов гликозилирования) может быть увеличен, по меньшей мере, примерно на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше по сравнению с уровнем гликозилирования соответствующей формы немодифицированной ADA2 или ADA2 дикого типа.

Примеры модификаций, предусмотренных в настоящем документе, включают введение не нативного сайта гликозилирования за счет модификации одной или несколькими аминокислотными заменами, которые включают, но не ограничиваясь этим, замену на: N в положении, соответствующем положению 20, и S в положении, соответствующем положению 22; N в положении, соответствующем положению 371, и S в положении, соответствующем положению 373; N в положении, соответствующем положению 372, и S в положении, соответствующем положению 374; N в положении, соответствующем положению 403, и S в положении, соответствующем положению 405; и N в положении, соответствующем положению 404, и S в положении, соответствующем положению 406, каждая согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, аминокислотная замена (аминокислотные замены), предназначенные для введения не нативного сайта гликозилирования может включать: R20N/V22S; K371N/D373S; K372N/I374S; T403N/H405S; или G404N/P406S, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В других примерах, модификации, предусмотренные в настоящем документе, включают введение не нативного сайта гликозилирование за счет модификации одной или несколькими аминокислотными заменами в PRB

домене или около PRB домена. Примеры модификаций, предусмотренных в настоящем документе, включают введение не нативного сайта гликозилирования за счет модификации одной или несколькими аминокислотными заменами, которые включают, но не ограничиваясь этим, замену на:

N в положении, соответствующем положению 125, и A в положении, соответствующем положению 126; N в положении, соответствующем положению 127, и S в положении, соответствующем положению 129; N в положении, соответствующем положению 126, и T в положении, соответствующем положению 128; N в положении, соответствующем положению 112, и T в положении, соответствующем положению 114; N в положении, соответствующем положению 134, C в положении, соответствующем положению 135, и T в положении, соответствующем положению 136; N в положении, соответствующем положению 134, S в положении, соответствующем положению 135, и T в положении, соответствующем положению 136; N в положении, соответствующем положению 142, и S в положении, соответствующем положению 144; N в положении, соответствующем положению 137, и T в положении, соответствующем положению 139; N в положении, соответствующем положению 111, и S в положении, соответствующем положению 113, каждая согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на положения, приведенные в SEQ ID NO: 5. Например, аминокислотная замена (аминокислотные замены), предназначенные для введения не нативного сайта гликозилирования в PRB домене или около PRB домена, может включать: R125N/P126A; S127N/K129S; P126N/E128T; R112N/I114T; I134N/L135C/L136T; I134N/L135S/L136T; R142N/Q144S; E137N/Y139T; или P111N/G113S, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

В других примерах, также в настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды ADA2, которые содержат добавление (т.е., вставку) одного или нескольких непрерывных остатков на N-конце или C-конце. За счет таких замен может быть введен не нативный сайт гликозилирования. Модифицированные полипептиды ADA2 могут содержать вставку до или примерно до или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или

более аминокислотных остатков на N-конце или С-конце или на обоих концах. Например, добавление или вставка аминокислот может обеспечить изменение сайтов гликозилирования в кодируемом белке. Примером модификации является вставка ---→N1/---→A2/---→S3 на N-конце, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные положения, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO:274-279 и 552-560.

Также в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, которые вводят не нативный сайт гликозилирования, в сочетании с другими делециями, вставками, заменами и/или аминокислотными заменами, предусмотренными в настоящем документе. Например, предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен по сравнению с полипептидом ADA2 сравнения, не содержащим модификации (т.е., немодифицированная ADA2). Варианты полипептида ADA2 могут содержать любые две или более аминокислотных замен, предусмотренных в настоящем документе, при условии, что полученный вариант ADA2 обладает активностью аденозиндезаминазы или сохраняет активность аденозиндезаминазы. Две или более аминокислотных замен могут приводить к такой же измененной активности или к другой измененной активности. Например, одна или несколько аминокислотных замен могут вводить не нативный сайт гликозилирования, а другая аминокислотная замена (аминокислотные замены) может приводить к увеличенной активности аденозиндезаминазы. Следовательно, полученные варианты полипептида ADA2 обладают двумя или более измененными активностями или свойствами.

Например, в настоящем документе предусмотрены варианты полипептида ADA2, которые содержат аминокислотные замены R219Q/S262N/---→N1/---→A2/---→S3; R219Q/S262N/R20N/V22S; R219Q/S262N/K371N/D373S; R219Q/S262N/K372N/I374S; R219Q/S262N/T403N/H405S; R219Q/S262N/G404N/P406S; R219Q/S262N/R125N/P126A; R219Q/S262N/S127N/K129S; R219Q/S262N/P126N/E128T; R219Q/S262N/R112N/I114T; R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T;

R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T; R219Q/S262N/R142N/Q144S; R219Q/S262N/E137N/Y139T; или R219Q/S262N/P111N/G113S, согласно нумерации зрелой формы, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5.

Примерами таких вариантов полипептида ADA2 являются любые, приведенные в любой из SEQ ID NO: 596-601 или 607-615, или их каталитически активная часть.

b. Молекулы нуклеиновых кислот

Также в настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любые варианты полипептида ADA2, предусмотренные в настоящем документе. Модифицированная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует любые варианты полипептида ADA2, предусмотренные в настоящем документе, включает изменения кодонов, соответствующие модификациям, предусмотренным в настоящем документе (*например,* замене, вставке или добавлению или делеции одного или нескольких нуклеотидов). Специалист в данной области техники, которому известны кодоны, соответствующие различным аминокислотам, способен установить такие изменения кодонов, основываясь на приведенных в настоящем документе примерах модифицированных аминокислот. В конкретных примерах, последовательность нуклеиновой кислоты может быть кодон-оптимизированной, например, для повышения уровня экспрессии кодируемой последовательности. Конкретная частота использования кодона зависит от организма-хозяина, в котором экспрессируется модифицированный полипептид. Специалисту в данной области техники известны оптимальные кодоны для экспрессии в клетках млекопитающих или в человеческих клетках, бактериях или дрожжах, в том числе, например, в *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. Например, информация о частоте использования кодонов доступна из Codon Usage Database по адресу kazusa.or.jp.codon (*см., например,* Richmond (2000) *Genome Biology*, 1:241 с описанием базы данных). Смотрите также, Forsburg (2004) *Yeast*, 10:1045-1047; Brown *et al.* (1991) *Nucleic Acids Research*, 19:4298; Sharp *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.*, 12:8207-8211; Sharp *et al.* (1991)

Yeast, 657-78). Предусмотрены векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, для экспрессии и продукции полипептидов ADA2.

c. Получение вариантов белка ADA2

Варианты полипептида ADA2 и кодирующие молекулы нуклеиновых кислот, предусмотренные в настоящем документе, могут быть получены стандартными методами рекомбинантных ДНК, известными специалисту в данной области техники. Может быть использован любой способ осуществления мутации одной или нескольких аминокислот в целевом белке, известный в данной области техники. Способы включают стандартный сайт-направленный или случайный мутагенез кодирующих молекул нуклеиновых кислот или способы твердофазного синтеза полипептидов. В частности, могут быть использованы способы полного химического синтеза, в том числе пептидный синтез с последующим лигированием пептидов. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид ADA2, могут быть подвергнуты мутагенезу, например, случайному мутагенезу кодирующей нуклеиновой кислоты, ПЦР с внесением ошибок, сайт-направленному мутагенезу (с использованием, *например,* набора, такого как набор QuikChange, доступный из Stratagene), перекрывающейся ПЦР, генной перетасовке или другим рекомбинантным способам. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды, далее может быть введена в клетку-хозяин для гетерологичной экспрессии. В некоторых примерах, варианты полипептида ADA2 получают синтетическим способом, например, используя полный химический синтез, твердофазный пептидный синтез или пептидный синтез в растворе.

Примеры способов получения и экспрессии молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид ADA2, в том числе любой вариант полипептида ADA2, описаны в Разделе E. В зависимости от способа получения варианта молекулы ADA2, или конкретной природы модификации (модификаций), варианты полипептида ADA2, предусмотренные в настоящем документе, могут быть получены в виде мономера, димера или другого мультимера. Например, вариант ADA2 представляет собой гетеродимер или гомодимер.

В частности, ADA2 в норме существует в виде гомодимера, состоящего из двух идентичных полипептидных цепей. Как описано выше, неполярные взаимодействия между остатками двух идентичных полипептидных субъединиц опосредуют образование гомодимера в процессе секреции ADA2 из клеток. Поскольку ADA2 представляет собой гомодимер, понятно, что упоминание аминокислотной последовательности полипептида ADA2 сравнения или немодифицированного полипептида ADA2 относится к последовательности аминокислот одной субъединицы полипептида ADA2. Вариант ADA2 может содержать одну или несколько полипептидных субъединиц ADA2, являющихся одинаковыми (т.е., гомодимер) или разными (т.е., гетеродимер). Например, вариант гомодимера ADA2 легко продуцируется и секретируется клетками, трансформированными молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида ADA2, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13-63, 71-285 или 552-931, или его каталитически активный фрагмент. Если в клетках содержится две или больше разных молекул нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует разный полипептид ADA2, может быть получен гетеродимер.

В одном из примеров, вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, представляет собой димер. Например, полученный вариант полипептида ADA2 представляет собой гомодимер, который содержит первую и вторую полипептидные субъединицы, являющиеся одинаковыми, т.е., обе имеют одинаковую аминокислотную последовательность, содержащую идентичную модификацию (модификации) по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида ADA2 сравнения или немодифицированного полипептида ADA2. Гомодимер может образоваться в результате трансформации клетки молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида, что при секреции приводит к неполярному взаимодействию между остатками двух вариантов полипептидных субъединиц и образованию димера.

В другом примере, полученный полипептид ADA2 представляет собой гетеродимер, который содержит первую и вторую субъединицы полипептида, являющиеся разными. В таком примере, одна из субъединиц полипептида или

обе субъединицы полипептида, первая и вторая, содержат последовательность аминокислот, содержащую модификацию (модификации) по сравнению с аминокислотной последовательностью ADA2 сравнения или немодифицированной ADA2. В некоторых случаях, обе субъединицы полипептида, первая и вторая, содержат последовательность аминокислот, содержащую модификацию (модификации) по сравнению с ADA2 сравнения или немодифицированной ADA2, но природа модификаций разная. Гетеродимер может образоваться в результате трансформации клетки первой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей первый вариант полипептидной субъединицы, и второй молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей второй другой вариант полипептидной субъединицы. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать субъединицу полипептида, содержащую последовательность аминокислот ADA2 сравнения или ADA2 дикого типа, или может кодировать вариант субъединицы полипептида, содержащий последовательность аминокислот, содержащую модификацию (модификации) по сравнению с аминокислотной последовательностью ADA2 сравнения или немодифицированной ADA2. Гетеродимер образуется при экспрессии и секреции из клетки в результате неполярного взаимодействия между остатками двух полипептидных субъединиц, опосредующего образованием димера. В таких процессах обычно образуется смесь димерных молекул, включающая гомодимеры и гетеродимеры. Для получения гетеродимеров, могут понадобиться дополнительные стадии очистки. Например, первый и второй полипептиды могут быть сконструированы таким образом, чтобы включать метку с хелатами металлов или другим эпитопом, при этом метки у них разные. Меченые домены могут быть использованы для быстрой очистки методом металл-хелатной хроматографии, и/или с помощью антител, чтобы обеспечить возможность обнаружения вестерн блоттингом, иммунопреципитацией или в биоанализах с деплецией/блокированием активности.

В других примерах, вариант полипептида ADA2 представляет собой мономер. Мономер может быть получен мутацией одного или нескольких остатков, участвующих в димеризации белка, при условии, что активность аденозиндезаминазы сохраняется. Примеры остатков, которые могут быть

выбраны для мутагенеза, включают, но не ограничиваясь ими, аминокислотные остатки 1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 344, 362 или 366, со ссылкой на аминокислотные остатки, приведенные в SEQ ID NO: 5. Остатки могут быть замещены на один из девятнадцати других аминокислотных остатков в этих положениях. Специалист в данной области техники способен создать и оценить образование мономера полипептида. Например, образование мономера может быть оценено, а мономеры могут быть очищены с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Активность аденозиндезаминазы также может быть оценена, например, с помощью любого анализа, описанного в настоящем документе или известного в данной области техники.

В некоторых примерах, димерные или другие мультимерные молекулы варианта ADA2 могут быть образованы путем конъюгации или слияния кодируемого варианта полипептида ADA2 с любым фрагментом или другим полипептидом, которые сами по себе способны взаимодействовать с образованием стабильной структуры. Например, кодируемые по отдельности полипептиды ADA2, где, по меньшей мере, один полипептид представляет собой вариант полипептида ADA2, могут быть соединены посредством мультимеризации, при этом мультимеризация полипептидов опосредована доменом мультимеризации. Варианты димера или мультимера ADA2 могут быть образованы путем создания химерной молекулы, в которой вариант ADA2 связан, напрямую или не напрямую, с доменом мультимеризации. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант ADA2, может быть соединена (напрямую или не напрямую) с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен мультимеризации. Например, димер варианта ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может содержать первую субъединицу полипептида ADA2, связанную напрямую или не напрямую посредством линкера с доменом мультимеризации, и вторую субъединицу полипептида ADA2, связанную напрямую или не напрямую посредством линкера с доменом мультимеризации, где один из полипептидов или оба полипептида, первый и второй, представляют собой вариант полипептида ADA2. Первый и второй полипептиды ADA2 могут быть одинаковые или разные. Примером домена мультимеризации является Fc домен, который описан далее.

Гомо- или гетеромультимерные полипептиды могут быть получены путем совместной экспрессии отдельных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды ADA2. Химерные полипептиды ADA2 могут быть легко получены и секретированы клетками, такими как клетки млекопитающих, трансформированными соответствующей молекулой нуклеиновой кислоты. Например, клетка может быть трансформирована первой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант ADA2, и второй молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей такую же или другую ADA2. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать субъединицу полипептида, содержащую последовательность аминокислот ADA2 сравнения или ADA2 дикого типа, или может кодировать вариант субъединицы полипептида, содержащий последовательность аминокислот, содержащую модификацию (модификации) по сравнению с аминокислотной последовательностью ADA2 сравнения или немодифицированной ADA2. Секретируемые формы полипептида ADA2 включают те, где вариант ADA2 представляет собой гомодимер первого кодируемого варианта полипептида ADA2, гомодимер второго кодируемого полипептида ADA2, например, дикого типа, или второго варианта полипептида ADA2, и гетеродимеры ADA2, содержащие две разные полипептидные субъединицы. В некоторых случаях, могут образовываться мультимеры более высокого порядка.

Домены мультимеризации хорошо известны специалистам в данной области техники. Обычно, домен мультимеризации включает любые домены, способные образовывать стабильные белок-белковые взаимодействия. Домены мультимеризации могут взаимодействовать посредством иммуноглобулиновой последовательности (*например,* Fc домен; см., *например,* международные опубликованные патенты номер WO 93/10151 и WO 2005/063816; опубликованную заявку США номер 2006/0024298; патент США номер 5,457,035), лейциновой молнии (*например,* из ядерных трансформирующих белков fos и jun, или прото-онкогена c-myc, или из транскрипционного фактора общего контроля метаболизма азота (General Control of Nitrogen) (GCN4)), гидрофобной области, гидрофильной области или свободных тиольных групп, которые образуют межмолекулярную дисульфидную связь между химерными

молекулами гомо- и гетеромультимера. Кроме того, домен мультимеризации может включать аминокислотную последовательность, содержащую выступ, комплементарную аминокислотной последовательности, содержащей впадину, например, как описано, например, в патенте США номер 5, 731,168; международных опубликованных патентах номер WO 98/50431 и WO 2005/063816; Ridgway *et al.* (1996) *Protein Engineering*, 9:617-621. Такие области мультимеризации могут быть созданы таким образом, чтобы стерические взаимодействия не только способствовали стабильному взаимодействию, но также способствовали предпочтительному образованию гетеродимеров, а не гомодимеров из смеси химерных мономеров. Обычно выступы могут быть созданы путем замены небольших боковых цепей аминокислот на поверхности первого полипептида на боковые цепи большего размера (*например,* тирозин или триптофан). Соответствующие полости идентичного или сходного размера с выпуклостями необязательно создают на поверхности второго полипептида путем замены большой боковой цепи аминокислоты на меньшую боковую цепь (*например*, аланин или треонин).

Полипептид ADA2, например, любой вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может быть соединен в любом месте, но, как правило, через его N- или C-конец с N- или C-концом домена мультимеризации с образованием химерного полипептида. Связь может быть прямой или не прямой посредством линкера. Также, химерный полипептид может представлять собой белок слияния или может быть образован посредством химической связи, например, ковалентных или не ковалентных взаимодействий. Например, для получения химерного полипептида, содержащего домен мультимеризации, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид ADA2, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей последовательность домена мультимеризации, напрямую или не напрямую или необязательно посредством линкерного домена. Конструкция может кодировать химерный белок, в котором C-конец полипептида ADA2 соединен с N-концом домена мультимеризации. В некоторых случаях, конструкция может кодировать химерный белок, в котором

N-конец полипептида ADA2 соединен с N- или С-концом домена мультимеризации.

В примерах, в которых домен мультимеризации представляет собой полипептид, составной ген, кодирующий химерный полипептид ADA2-домен мультимеризации, вставляется в соответствующий вектор экспрессии. Полученные химерные белки ADA2-домен мультимеризации могут экспрессироваться в клетках-хозяевах, трансфицированных рекомбинантным вектором экспрессии, и далее собираться в мультимеры, в которых домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультивалентных полипептидов. Химическая связь доменов мультимеризации с полипептидами ADA2 также может быть осуществлена посредством гетеробифункциональных линкеров.

Полученные химерные полипептиды и мультимеры, образованные из них, могут быть очищены любым подходящим способом, таким как, например, аффинная хроматография на колонках с белком А или белком G. Если клетки трансфицировать двумя молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих разные химерные полипептиды ADA2, будут образовываться гомо- и гетеродимеры. Условия экспрессии могут быть подобраны таким образом, что образование гетеродимера будет предпочтительнее, чем образование гомодимера. Например, в случае мультимеров, образованных взаимодействием дисульфидной связи Fc домена мультимеризации, гомодимеры могут быть восстановлены в условиях, которые благоприятствуют разрушению межцепочечных дисульфидных связей, но не влияют на внутрицепочечные дисульфидные связи. Альтернативно, сдвиг в сторону образования этого типа гетеродимера может быть достигнут за счет использования генетически сконструированных и экспрессируемых молекул слияния ADA2, содержащих домен мультимеризации, который способствует образованию гетеродимеров, например, содержащий комбинацию *c-jun* и *c-fos* для образования лейциновой молнии. Поскольку при наличии лейциновых молний образуются преимущественно гетеродимеры, лейциновые молнии могут быть использованы, если желательно образование преимущественно гетеродимеров. Полипептиды ADA2, содержащие Fc область или другой домен мультимеризации, также могут быть сконструированы таким образом, чтобы

содержать метку, облегчающую очистку желаемых гетеродимеров. Продукты ядерных онкогенов *fos* и *jun* содержат домены лейциновых молний, которые преимущественно образуют гетеродимер (O'Shea *et al.* (1989) *Science*, 245:646; Turner and Tijian (1989) *Science*, 243:1689). Например, было показано, что домены лейциновых молний человеческих транскрипционных факторов *c-jun* и *c-fos* образуют стабильные гетеродимеры в стехиометрическом соотношении 1:1 (см., *например,* Busch and Sassone-Corsi (1990) *Trends Genetics*, 6:36-40; Gentz *et al.* (1989) *Science*, 243:1695-1699). Несмотря на то, что также было показано образование гомодимеров *jun-jun*, они примерно в 1000 раз менее стабильны, чем гетеродимеры *jun-fos*.

D. КОНЪЮГАТЫ И БЕЛКИ СЛИЯНИЯ ADA2

Любая молекула ADA2, в том числе любая, приведенная в настоящем документе, может быть конъюгирована, напрямую или не напрямую, с одним или несколькими гетерологичными фрагментами. ADA2 может представлять собой ADA2 дикого типа, включая ее аллельные и межвидовые варианты, или может представлять собой любой вариант, описанный в настоящем документе в Разделе C.2. выше. Молекула ADA2 в конъюгате может представлять собой мономер или димер, например, гетеродимер или гомодимер. Как правило, ADA2 в конъюгате представляет собой гомодимер. Гетерологичный фрагмент может быть конъюгирован с одной или обеими полипептидными субъединицами димера.

Например, ADA2 может быть любой, которая содержит полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5 или 326-336, 338-342, 375 или 380-383, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 5 или 326-336, 338-342, 375 или 380-383, или ее каталитически активным фрагментом. В одном из примеров, ADA2 в конъюгате, предусмотренном в настоящем документе, может содержать полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5 или 326-336, 338-342, 375 или 380-383, или ее каталитически активный фрагмент, например, любой из SEQ ID NO: 5, 326-334, 340, 375 или

380-383, или ее каталитически активный фрагмент. Например, ADA2 в конъюгате, предусмотренном в настоящем документе, может содержать полипептид, имеющий последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или ее каталитически активную часть. Каталитически активная часть может представлять собой каталитически активную часть, у которой может отсутствовать PRB домен целиком или часть PRB домена, например, приведенная в любой из SEQ ID NO: 548-550 или 579.

В других примерах конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, конъюгат содержит вариант полипептида ADA2, например, любой, описанный в настоящем документе. Например, конъюгаты, предусмотренные в настоящем документе, могут представлять собой ADA2, которая содержит вариант полипептида, приведенный в любой из SEQ ID NO: 13-63, 71-285 или 552-931.

Гетерологичный фрагмент может включать белковые или полипептидные фрагменты или не белковые фрагменты. Например, гетерологичный фрагмент может представлять собой пептид низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту, углевод и полимер, но не ограничиваясь этим. Гетерологичный фрагмент может быть связан, напрямую или не напрямую, с молекулой белка ADA2. Например, гетерологичный фрагмент может представлять собой белковый или полипептидный фрагмент, который может быть напрямую или не напрямую конъюгирован с полипептидом ADA2, или продуцироваться в виде белков слияния, которые слиты напрямую или не напрямую. В других случаях, гетерологичный фрагмент представляет собой не пептидный фрагмент, который конъюгирован с молекулами ADA2.

Белок ADA2 может быть конъюгирован с одним или несколькими гетерологичными фрагментами, например, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большим числом гетерологичных фрагментом. Гетерологичный фрагмент может представлять собой гетерологичный полипептидный фрагмент или гетерологичный не полипептидный фрагмент, или и тот, и другой. В других примерах, гетерологичные фрагменты могут включать комбинацию гетерологичного полипептида и не полипептидного фрагмента. В некоторых примерах, все гетерологичные фрагменты являются идентичными. В некоторых

примерах, по меньшей мере, один гетерологичный фрагмент отличается от других гетерологичных фрагментов. В некоторых примерах, любые ADA2, предусмотренные в настоящем документе, могут быть последовательно конъюгированы с двумя, тремя или больше, чем с тремя гетерологичными фрагментами. В других примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть конъюгирована с двумя, тремя или больше, чем с тремя гетерологичными фрагментами, где, по меньшей мере, дополнительный фрагмент расположен между двумя гетерологичными фрагментами (*например,* полипептид ADA2, линкер, расщепляемый протеазой субстрат, саморасщепляющийся спейсер или их комбинация).

Конъюгация с гетерологичными фрагментами может придавать выгодные свойства молекуле ADA2 по сравнению с молекулой ADA2, не конъюгированной с гетерологичным фрагментом. Примерами гетерологичных фрагментов являются фрагменты, которые увеличивают время полужизни молекулы *in vivo*. Другие примеры выгодных свойств, обусловленных гетерологичным фрагментом, включают, увеличение экспрессии белка в экспрессирующих системах млекопитающих, улучшение биофизических свойств, таких как стабильность и растворимость, улучшение очистки и обнаружения, визуализации и локализации белка и/или увеличение ферментативной активности, но не ограничиваясь этим. Например, гетерологичный фрагмент может облегчать обнаружение, визуализацию или локализацию молекулы белка ADA2 или ее фрагмента, содержащих гетерологичный фрагмент. Обнаружение, визуализацию и/или локализацию любой ADA2 и ее фрагмента можно осуществлять *in vivo, in vitro, ex vivo* или в их комбинации.

В некоторых случаях, после конъюгации с ADA2 или ее фрагментом, гетерологичный фрагмент увеличивает стабильность ADA2 или ее фрагмента. Например, наличие гетерологичного фрагмента может способствовать поддержанию одного или нескольких физических свойств ADA2 в ответ на внешние условия (*например,* повышение температуры или условия низкого или высокого pH) в сравнении с физическим свойством в отсутствии гетерологичного фрагмента. В некоторых примерах, физическое свойство может

включать поддержание ковалентной структуры ADA2 (*например,* отсутствие протеолитического расщепления, нежелательного окисления или дезамидирования). В других примерах физическое свойство может включать поддержание правильно фолдированного состояния (*например,* отсутствие растворимых или нерастворимых агрегатов или преципитатов). Стабильность любой ADA2 или конъюгата ADA2 может быть измерена путем оценки биофизического свойства белка, например, термостабильности, профиля развертывания белка в зависимости от pH, стабильного удаления гликозилирования, растворимости, биохимической функции (*например,* активности аденозиндезаминазы или активности связывания с гепарином) и/или их комбинаций. Стабильность может быть измерена способами, известными в данной области техники, такими как, HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), SEC (эксклюзионная хроматография), DLS (динамическое светорассеяние). Способы измерения термостабильности включают, дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), дифференциальную сканирующую флуориметрию (DSF), спектроскопия кругового дихроизма (CD) и анализ термического воздействия, но не ограничиваясь этим. Примеры способов оценки стабильности любой ADA2 или конъюгата, описаны ниже в Разделе F.

В некоторых примерах, после конъюгации с ADA2 или ее фрагментом, наличие гетерологичного фрагмента снижает или ослабляет связывание ADA2 с гепарином и другими гликозаминогликанами (GAG) по сравнению с белком ADA2, не содержащим гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). Например, конъюгаты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, включает те, которые обладают не более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от связывания с гепарином белка ADA2, не содержащего гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). Например, в настоящем документе показано, что пегилированная ADA2 обладает пониженным связыванием с гепарином по сравнению с соответствующей не пегилированной ADA2 (см., *например,* Пример 8). Как правило, связывание с гепарином наблюдается, когда ADA2

находится в димерной форме, и конъюгат ADA2 представляет собой димер. Также понятно, что для осуществления сравнения связывание конъюгированной и не конъюгированной формы оценивают в дни и тех же или по существу одни и тех же условиях. В частности, уменьшение связывания в присутствии гетерологичного фрагмента в конъюгате может быть вызвано стерической блокадой и/или изменением электростатических зарядов на поверхности.

В примерах конъюгатов, предусмотренных в настоящем документе, гетерологичный фрагмент улучшает одно или несколько свойств ADA2 (*например,* время полужизни), не влияя при этом существенно на биологическую активность или функцию белка ADA2 (*например,* активность аденозиндезаминазы). Например, конъюгаты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, обладают примерно от 50% до 500%, например, примерно от 50% до 400%, от 50% до 300%, от 50% до 200%, от 50% до 150%, от 50% до 100%, от 50% до 80%, от 80% до 400%, от 80% до 300%, от 80% до 200%, от 80% до 150%, от 80% до 100%, от 100% до 400%, от 100% до 300%, от 100% до 200% или от 100% до 150% активности аденозиндезаминазы по сравнению с белком ADA2, не содержащим гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). Например, конъюгат ADA2 может обладать, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% или больше активности аденозиндезаминазы по сравнению с полипептидом ADA2, не содержащим гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). В некоторых случаях, конъюгаты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, обладают увеличенной или улучшенной активностью аденозиндезаминазы по сравнению с полипептидом ADA2, не содержащим гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2), например, больше 100% или больше от активности аденозиндезаминазы. Как правило, ADA2 проявляет активность аденозиндезаминазы, находясь в димерной форме, и конъюгат ADA2 представляет собой димер. Также понятно, что для осуществления сравнения

связывание аденозина конъюгированной и не конъюгированной формы оценивают в дни и тех же или по существу одни и тех же условиях.

1. Удлиняющие время полужизни фрагменты

Не ограничивающие примеры гетерологичных фрагментов включают любые, которые, когда конъюгированы или связаны (напрямую или не напрямую) с молекулой ADA2, увеличивают время полужизни *in vivo* и/или *in vitro* по сравнению со свободной или не конъюгированной ADA2. Время полужизни любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть определено любым способом, известным специалисту в данной области техники и/или описанным в настоящем документе, *например,* с помощью анализа активности аденозиндезаминазы. Примеры таких удлиняющих время полужизни фрагментов описаны в подразделах ниже.

Например, гетерологичные фрагменты представляют собой пептиды и полипептиды либо с неструктурированными, либо со структурированными характеристиками, которые связаны с продлением времени полужизни ADA2 *in vivo,* когда ADA2 конъюгирована с ними. Неограничивающие примеры включают альбумин, фрагменты альбумина, Fc фрагменты иммуноглобулинов, β-субъединицу С-концевого пептида (CTP) β-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, HAP последовательности, XTEN последовательности, трансферрин или его фрагменты, полипептид PAS, полиглициновые линкеры, полисериновые линкеры, альбумин-связывающие фрагменты, конъюгаты или удлиняющие время полужизни фрагменты на основе неприродных аминокислот, или любые фрагменты, производные, варианты или комбинации этих полипептидов.

Гетерологичный фрагмент может представлять собой удлиняющий время полужизни фрагмент, *т.е.,* гетерологичный фрагмент, который увеличивает время полужизни *in vivo* любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, по сравнению со временем полужизни *in vivo* ADA2, у которой отсутствует такой гетерологичный фрагмент. Время полужизни *in vivo* любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть определено любым способом, известным специалистам в данной области техники и/или

описанным в настоящем документе, *например,* с помощью анализов активности аденозиндезаминазы.

Примеры удлиняющих время полужизни фрагментов, которые могут быть конъюгированы, напрямую или не напрямую, с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают: биосовместимые жирные кислоты и их производные, гидроксиалкилкрахмал (HAS) (*например,* гидроксиэтилкрахмал (HES)), полиэтиленгликоль (PEG), Poly (Gly_x- $Ser_y)_n$, гомоаминокислотные полимеры (HAP), гиалуроновую кислоту (HA), полимеры гепарозана (HEP), полимеры на основе фосфорилхолина (PC полимер), флексимеры, декстран, полисиаловые кислоты (PSA), Fc домен, трансферрин, альбумин, эластиноподобные пептиды, XTEN последовательности, альбумин-связывающие пептиды, CTP пептид, неприродные аминокислоты или неприродные конъюгаты аминокислот и любые их комбинации.

В некоторых примерах, после конъюгации с ADA2 или ее фрагментом, наличие одного или нескольких удлиняющих время полужизни фрагментов приводит к увеличению времени полужизни любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, по сравнению с времем полужизни ADA2, у которой отсутствует один или несколько таких удлиняющих время полужизни фрагментов (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). Например, конъюгаты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, имеют время полужизни, которое длиннее, по меньшей мере, примерно на 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 225%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800% или больше, чем время полужизни полипептида ADA2, не содержащего гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2), или длиннее на 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1600%, 1700%, 1800%, 1900%, 2000%, 3000%, 4000%, 5000%, 6000%, 7000%, 8000%, 9000%, 10000% или больше, чем время полужизни полипептида ADA2, не содержащего гетерологичный фрагмент (т.е., свободная или не конъюгированная ADA2). В некоторых примерах, время полужизни любого конъюгата ADA2, предусмотренного в настоящем документе, связанного, напрямую или не напрямую, с удлиняющим время полужизни фрагментом, примерно в 1,5-20 раз, примерно в 1,5-15 раз, примерно в 1,5-10

раз, примерно в 2-10 раз, примерно в 2-9 раз, примерно в 2-8 раз, примерно в 2-7 раз, примерно в 2-6 раз, примерно в 2-5 раз, примерно в 2-4 раза, примерно в 2-3 раза, примерно в 2,5-10 раз, примерно в 2,5-9 раз, примерно в 2,5-8 раз, примерно в 2,5-7 раз, примерно в 2,5-6 раз, примерно в 2,5-5 раз, примерно в 2,5-4 раза, примерно в 2,5-3 раза, примерно в 3-10 раз, примерно в 3-9 раз, примерно в 3-8 раз, примерно в 3-7 раз, примерно в 3-6 раз, примерно в 3-5 раз, примерно в 3-4 раза, примерно в 4-6 раз, примерно в 5-7 раз или примерно в 6-8 раз больше, чем время полужизни соответствующей ADA2, у которой отсутствует такой удлиняющий время полужизни фрагмент. Как правило, время полужизни для активности *in vivo* наблюдается, когда ADA2 находится в форме димера, и конъюгат ADA2 представляет собой димер. Также понятно, что для осуществления сравнения время полужизни конъюгированной и не конъюгированной формы оценивают в дни и тех же или по существу одни и тех же условиях.

В некоторых примерах, время полужизни любого конъюгата ADA2, предусмотренного в настоящем документе, связанного, напрямую или не напрямую, с удлиняющим время полужизни фрагментом может составлять или составлять, по меньшей мере, или составлять, по меньшей мере, примерно 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 25 часов, 26 часов, 27 часов, 28 часов, 29 часов, 30 часов, 32 часа, 34 часа, 36 часов, 38 часов, 40 часов, 42 часа, 46 часов, 48 часов, 50 часов, 55 часов, 60 часов, 65 часов, 70 часов, 75 часов, 80 часов или больше. Например, время полужизни любого конъюгата ADA2, предусмотренного в настоящем документе, может составлять от 10 часов до 60 часов, например, от 12 часов до 48 часов или от 13 часов до 36 часов. Например, в Примере 9 показано, что конъюгат ADA2, представляющий собой пегилированную ADA2, имеет время полужизни, равное примерно или приблизительно 12-14 часам, и пегилированные молекулы варианта ADA2 (*например,* R20E или K371D) имеют даже большее время полужизни, равное примерно или приблизительно 16-24 часам. В Примере 14 показано, что другие пегилированные молекулы варианта ADA2 (*например,* R219Q/S262N) имеют

даже большее время полужизни, равное примерно или приблизительно 39-47 часам.

В нижеследующих подразделах описаны примеры удлиняющих время полужизни фрагментов в конъюгатах ADA2, предусмотренных в настоящем документе.

a. Полипептиды низкой сложности

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, с, по меньшей мере, одним гетерологичным фрагментом, который представляет собой полипептид с низкой композиционной и/или структурной сложностью (*например,* неупорядоченный полипептид, у которого отсутствует вторичная или третичная структура в растворе при физиологических условиях). В одном из примеров, последовательности полипептидов низкой сложности состоят из неструктурированных гидрофильных аминокислотных полимеров. Полипептиды низкой сложности могут придавать выгодные свойства белкам, например, когда белок подвергается действию высокой температуры или жестким условиям, например, очистке с помощью HPLC.

b. С-концевой пептид (CTP) β-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, с гетерологичным фрагментом, который включает один С-концевой пептид (CTP) β-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, или его фрагмент, вариант или производное. Известно, что один или несколько CTP пептидов, вставленных в рекомбинантный белок, увеличивают время полужизни этого белка *in vivo* (см., *например,* патент США номер 5,712,122). Примеры CTP пептидов включают DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO:303) или SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:304). (См., *например,* опубликованный патент США номер US 2009/0087411).

c. Константная область (Fc) иммуноглобулина или ее части

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, с Fc доменом или его

вариантом. Fc домены, фрагменты, варианты и производные известны специалисту в данной области техники и описаны, *например,* в патенте США номер 5,457,035; опубликованном патенте США номер US 2006/0024298, международных опубликованныз PCT заявках номер WO 2011/069164, WO 2012/006623, WO 2012/006635 или WO 2012/006633, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Препараты белков слияния, содержащие полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (в том числе с Fc доменом), были описаны, *например,* в Ashkenazi *et al.* (1991) *PNAS* 88: 10535; Byrn *et al.* (1990) *Nature*, 344:667; и Hollenbaugh and Aruffo, (2002) "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins," в *Current Protocols in Immunology*, Ch. 10, pp. 10.19.1-10.19.11.

Fc область содержит домены, обозначаемые как C_H (константные тяжелые) домены (C_HI, C_H2, C_H3 (необязательно C_H4)). В зависимости от изотипа (*m.e.,* IgG, IgM, IgA IgD или IgE), Fc область может содержать три или четыре CH домена. У некоторых изотипов (*например,* IgG) Fc области также содержат шарнирную область (см., Janeway *et al.* 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y). У человека, существует пять изотипов антител, классифицируемых на основе их тяжелых цепей, обозначаемых как дельта (δ), гамма (γ), мю (μ), альфа (α) и эпсилон (ε), и дающих, соответственно, следующие классы антител: IgD, IgG, IgM, IgA и IgE. IgA и IgG классы включают подклассы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Различия в последовательностях тяжелых цепей иммуноглобулинов приводят к тому, что различные изотипы отличаются, например, числом C доменов, наличием шарнирной области, числом и расположением межцепочечных дисульфидных связей. Например, тяжелые цепи IgM и IgE содержат дополнительный C домен (C_H4) вместо шарнирной области. Fc области IgG, IgD и IgA объединяются друг с другом посредством своих Cγ3, Cδ3 и Cα3 доменов, тогда как Fc области IgM и IgE димеризуются посредством своих Cμ4 и Cε4 доменов. IgM и IgA образуют мультимерные структуры с десятью и четырьмя антигенсвязывающими сайтами, соответственно.

Fc области известны специалисту в данной области техники, и любые из них могут использоваться в конъюгатах, предусмотренных в настоящем документе, при условии, что полученный конъюгат сохраняет активность аденозиндезаминазы. Fc область или ее часть для создания любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, могут быть получены из различных источников. В некоторых примерах, Fc область или ее часть получены из человеческого иммуноглобулина. Fc область или ее часть также могут быть получены из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, в том числе, например, из грызунов (*например,* из мыши, крысы, кролика, морской свинки) или приматов, не относящихся к человеку (*например,* из шимпанзе, макака). Более того, Fc область или ее часть также могут быть получены из иммуноглобулина, принадлежащего к любому классу, включая IgG (в том числе человеческие подклассы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (в том числе человеческие подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE и IgM. В одном из примеров, используется человеческий изотип IgG1. ADA2, предусмотренная в настоящем документе, конъюгированная с Fc областью иммуноглобулина, может обладать несколькими желаемыми свойствами, в том числе повышенной стабильностью, увеличенным временем полужизни (см. Capon *et al.* (1989) Nature 337:525), а также способностью связываться с Fc рецепторами, такими как неонатальный Fc рецептор (FcRn) (патенты США номер 6,086,875, 6,485,726, 6,030,613; WO 03/077834; US 2003/0235536, каждый из которых включен в настоящий документе посредством ссылки во всей свой полноте). В других примерах, в которых эффекторные функции, опосредуемые взаимодействиями Fc-Fc рецептор (FcR), должны быть минимизированы, осуществляется слияние с IgG изотипом, который слабо рекрутирует комплемент или эффекторные клетки, таким как, например, Fc из IgG2 или IgG4. Кроме того, для ковалентного связывания Fc с другим полипептидом и создания Fc химеры могут быть использованы линкеры.

Примеры последовательностей константных областей тяжелых цепей для человеческих подтипов IgG приведены в SEQ ID NO:355 (IgG1), SEQ ID NO:356 (IgG2), SEQ ID NO:357 (IgG3) и SEQ ID NO:358 (IgG4). Например, пример константной области тяжелой цепи приведен в SEQ ID NO:355, C_H1 домен

соответствует аминокислотам 1-98, шарнирная область соответствует аминокислотам 99-110, C_H2 домен соответствует аминокислотам 111-223 и C_H3 домен соответствует аминокислотам 224-330.

Модифицированные Fc домены также могут быть использованы в настоящем документе для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В некоторых примерах, Fc область модифицирована таким образом, что она демонстрирует измененное связывание с FcR, что приводит к изменению (*m.e.,* усилению или ослаблению) эффекторной функции по сравнению с эффекторной функцией Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. Таким образом, модифицированный Fc домен может обладать измененной аффинностью, в том числе увеличенной или уменьшенной аффинность в отношении Fc рецептора или не обладать аффинностью в отношении Fc рецептора, но не ограничиваясь этми. Например, разные подклассы IgG имеют разную аффинность к Fcγ рецепторам (FcγR), IgG1 и IgG3, как правило, существенно лучше связываются с рецепторами, чем IgG2 и IgG4. Кроме того, разные FcγR опосредуют разные эффекторные функции. FcγR1, FcγRIIa/c и FcγRIIIa являются положительными регуляторами активации, вызванной иммунными комплексами, характеризующимися наличием внутриклеточного домена с иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM). FcγRIIb, наоборот, имеет иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и, следовательно, является ингибирующим. В некоторых случаях, конъюгат ADA2, включающий Fc домен, предусмотренный в настоящем документе, может быть модифицирован с целью усиления связывания с белком комплемента C1q.

В некоторых примерах, Fc область, предназначенная для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может включать одну или несколько укороченных Fc областей, которые, тем не менее, достаточны для обеспечения свойств связывания Fc рецептора (FcR) с Fc областью. Например, часть Fc области, которая связывается с FcRn (*m.e.,* FcRn-связывающая часть), может приблизительно включать аминокислоты 282-438 в IgG1, при этом сайтами первичного контакта являются аминокислоты 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 в C_H2 домене и аминокислотные остатки 385-387,

428 и 433-436 в C_H3 домене (нумерация аминокислот на основе системы нумерации EU; смотрите Edelman *et al.* (1969) PNAS 63:78-85 и Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH номер 91-3242). Таким образом, Fc область в любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может включать FcRn-связывающую часть. FcRn-связывающие части могут быть получены из тяжелых цепей иммуноглобулина любого изотипа, в том числе из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. За счет изменения аффинности Fc области к рецептору можно модулировать эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства, связанные с Fc доменом. Модифицированные Fc домены известны специалисту в данной области техники и описаны в литературе, смотрите, *например,* патент США номер 5,457,035; опубликованный патент США номер US 2006/0024298; и международный опубликованный патент номер WO 2005/063816, в которых приведены примеры модификаций.

В некоторых примерах, Fc область, предназначенная для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может включать, по меньшей мере, один домен из: шарнирного (*например,* верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домена (приблизительно аминокислоты 216-230 Fc области антитела, основываясь на EU нумерации), C_H2 домена (приблизительно аминокислоты 231-340 Fc области антитела, основываясь на EU нумерации), C_H3 домена (приблизительно аминокислоты 341-438 Fc области антитела, основываясь на EU нумерации), C_H4 домена или их варианта, части или фрагмента. В других примерах, Fc область может включать Fc доменом полностью (*m.e.,* шарнирный домен, C_H2 домен и C_H3 домен). В некоторых примерах, Fc область может включать шарнирный домен (или его часть), слитый с C_H3 доменом (или его частью), шарнирный домен (или его часть), слитый с C_H2 доменом (или его частью), C_H2 домен (или его часть), слитый с C_H3 доменом (или его частью), C_H2 домен (или его часть), слитый как с шарнирным доменом (или его частью), так и с C_H доменом (или его частью). В других примерах, у Fc области отсутствует, по меньшей мере, часть C_H2 домена (*например,* C_H2 домен целиком или часть C_H2 домена). В конкретном примере, Fc область может включать аминокислоты, соответствующие аминокислотам с

221 по 447 (основываясь на системе нумерации EU; смотрите Edelman *et al.* (1969) PNAS 63:78-85 и Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH номер 91-3242).

Fc область, предназначенная для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может включать, например, модификацию (*например,* аминокислотную замену) по одному или нескольким аминокислотным положениям, раскрытым в международных опубликованных PCT заявках номер WO88/07089, W096/14339, WO98/05787, W098/23289, W099/51642, W099/58572, WO00/09560, WO00/32767, WO00/42072, WO02/44215, WO02/060919, WO03/074569, WO04/016750, WO04/029207, WO04/035752, WO04/063351, WO04/074455, WO04/099249, WO05/040217, WO04/044859, WO05/070963, WO05/077981, WO05/092925, WO05/123780, WO06/019447, WO06/047350 и WO06/085967; опубликованных патентах США номер US 2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; или патентах США номер 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; 7,083,784; 7,404,956; и 7,317,091, каждый из которых включен в настоящий документе посредством ссылки во всей своей полноте. В одном из примеров, специфическая модификация (*например,* специфическая замена одной или нескольких аминокислот, раскрытых в данной области техники) может быть сделана по одному или нескольким раскрытым аминокислотным положениям. В другом примере, могут быть сделаны разные изменения по одному или нескольким раскрытым аминокислотным положениям (*например,* разные замены по одному или нескольким аминокислотным положениям, раскрытым в данной области техники).

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть конъюгирована, по меньшей мере, с одной Fc областью в виде белка слияния. Как правило, такой белок слияния сохраняет, по меньшей мере, функционально активные шарнирный, C_H2 и C_H3 домены

соответствующей области тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, полноразмерная Fc последовательность IgG1 включает аминокислоты 99-330 из последовательности, приведенной в SEQ ID NO:355. Пример Fc последовательности для hIgG1 приведен в SEQ ID NO:359, и содержит почти всю шарнирную последовательность, и полную последовательность C_H2 и C_H3 доменов, приведенную в SEQ ID NO:355. Другим примером Fc полипептида является Fc полипептид, приведенный в SEQ ID NO:361. Другой пример Fc полипептида приведен в опубликованной PCT заявке номер WO 93/10151, и представляет собой одноцепочечный полипептид, начинающийся от N-концевой шарнирной области и заканчивающийся нативным C-концом Fc области человеческого IgG1 антитела (SEQ ID NO:359). Точное место связывания не критично: конкретные сайты хорошо известны и могут быть выбраны, чтобы оптимизировать биологическую активность, секрецию или связывание молекулы белка ADA2. Например, другой пример последовательности Fc полипептида начинается с аминокислоты C109 или P113 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO:355 (смотрите, *например,* опубликованную заявку США номер 2006/0024298).

Fc область, предназначенная для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, также может содержать аминокислотную замену, которая изменяет гликозилирование химерного белка, известного в данной области техники. Например, Fc область любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть конъюгирована с Fc областью, имеющей мутацию, которая приводит к пониженному гликозилированию (*например,* N- или O-связанному гликозилированию), или с измененной гликоформой Fc фрагмента дикого типа (*например,* гликан с низким содержанием фукозы или не содержащий фукозу).

Fc область, предназначенная для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, также может быть сконструирована таким образом, чтобы включать метку с хелатами металлов или другим эпитопом. Меченый домен может быть использован для быстрой очистки методом металл-хелатной хроматографии, и/или с помощью антител, чтобы обеспечить возможность обнаружения вестерн блоттингом,

иммунопреципитацией или в биоанализах с деплецией/блокированием активности.

d. Альбумин и его фрагменты или варианты

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, с гетерологичным фрагментом, который включает альбумин или его функциональный фрагмент. Человеческий сывороточный альбумин (HSA или HA), белок, длиной 609 аминокислот в его полноразмерной форме (пример последовательности приведен в SEQ ID NO:305), в значительной степени определяет осмотическое давление сыворотки, а также функционирует как переносчик эндогенных и экзогенных лигандов. Альбумин может представлять собой полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в опубликованных заявках на патенты США номер 2008/0194481, 2008/0004206, 2008/0161243, 2008/0261877 или 2008/0153751 или в опубликованных PCT заявках номер 2008/033413, 2009/058322 или 2007/021494, каждая из которых включена в настоящий документе посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может включать альбумин, его фрагмент или вариант, который также связан с гетерологичным фрагментом, выбранным из константной области иммуноглобулина или ее части (*например,* Fc область), PAS последовательность, HES, XTEN последовательности, PEG или любой их комбинации.

e. Альбумин-связывающий фрагмент

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, с гетерологичным фрагментом, который представляет собой альбумин-связывающий фрагмент, например, альбумин-связывающий пептид, бактериальный альбумин-связывающий домен, альбумин-связывающий фрагмент антитела, жирную кислоту или любые их комбинации.

Например, альбумин-связывающий белок может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий белок, антитело или фрагмент антитела, включая доменные антитела (смотрите патент США номер No. 6,696,245).

Альбумин-связывающий белок, например, может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий домен, такой как один из стрептококковых белков G (Konig, T. and A. Skerra, A. (1998) J Immunol. Methods 218:73-83). Другими примерами альбумин-связывающих пептидов, которые могут быть использованы для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, являются, например, те, которые имеют консенсусную последовательность Cys-Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3 -Xaa_4-Cys (SEQ ID NO:306), где Xaa_1 представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa_2 представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa_3 представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Xaa_4 представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr (опубликованный патент США номер 2003/0069395; Dennis *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 35035-35043).

Домен 3 из стрептококкового белка G (Kraulis *et al*, (1996) FEBS Lett. 378:190-194; Linhult *et al.* (2002) Protein Sci. 11:206-213) является примером бактериального альбумин-связывающего домена. Примеры альбумин-связывающих пептидов включают серии пептидов, имеющих коровую последовательность DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:307). (Смотрите, *например,* Dennis *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 35035-35043). Другие примеры альбумин-связывающих пептидов включают: RLIEDICLPRWGCLWEDD (SEQ ID NO:308); QRLMEDICLPRWGCLWEDDF (SEQ ID NO:309); QGLIGDICLPRWGCLWGDSVK (SEQ ID NO:310) и GEWWEDICLPRWGCLWEEED (SEQ ID NO:311).

Примеры альбумин-связывающих фрагментов антител, которые могут быть конъюгированы с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают те, которые раскрыты в Muller and Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. (2007) 9:319-326; Roovers *et al.* (2007), Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317; Holt *et al.* (2008) Prot. Eng. Design Sci., 21 :283-288, каждая из которых включена в настоящий документе посредством ссылки во всей своей полноте. Примером такого альбумин-связывающего фрагмента является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-иодофенил)бутанамидо)гексаноат ("Albu" tag) (Trussel *et al.* (2009) Bioconjugate Chem. 20:2286-2292).

Жирные кислоты, в частности, длинноцепочечные жирные кислоты (LCFA) и альбумин-связывающие соединения, подобные длинноцепочечным

жирным кислотам, могут быть использованы для удлинения времени полужизни *in vivo* любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Примером LCFA-подобного альбумин-связывающего соединения является 16-(l-(3-(9-(((2,5-диоксопирролидин-l-илокси) карбонилокси)-метил)-7-сульфо-9H-флуорен-2-иламино)-3-оксопропил)-2,5-диоксопирролидин-3-илтио) гексадекановая кислота (смотрите, *например,* WO 2010/140148).

f. PAS последовательности

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, по меньшей мере, с одним гетерологичным фрагментом, который представляет собой PAS последовательность, представляющую собой аминокислотную последовательность, которая включает, в основном, остатки аланина и серина, или которая включает, в основном, остатки аланина, серина и пролина. Аминокислотные последовательности образуют неупорядоченную конформацию в физиологических условиях. Соответственно, PAS последовательность представляет собой структурный блок, аминокислотный полимер или кассетную последовательность, состоящую из аланина, серина и пролина, которая может быть использована как часть гетерологичного фрагмента, конъюгированного с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

Специалист в данной области техники знает, что аминокислотный полимер также может образовывать неупорядоченную конформацию, когда другие остатки, отличные от аланина, серина и пролина, включены в качестве минорных компонентов в PAS последовательность. Минорные компоненты включают аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, которые в некотором количестве могут быть добавлены в PAS последовательность, *например,* примерно до 12%, *т.е.,* примерно 12 из 100 аминокислот PAS последовательности, примерно до 10%, *т.е.,* примерно 10 из 100 аминокислот PAS последовательности, примерно до 9%, *т.е.,* примерно 9 из 100 аминокислот, примерно до 8%, *т.е.*, примерно 8 из 100 аминокислот, примерно до 6%, *т.е.,* примерно 6 из 100 аминокислот, примерно до 5%, *т.е.,* примерно 5 из 100 аминокислот, примерно до 4%, *т.е.*, примерно 4 из 100 аминокислот,

примерно 3%, *т.е.,* примерно 3 из 100 аминокислот, примерно 2%, *т.е.,* примерно 2 из 100 аминокислот или примерно 1%, *т.е.,* примерно 1 из 100 аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr или Val.

В физиологических условиях, PAS участок последовательности образует неупорядоченную конформацию и за счет этого может опосредовать увеличение *in vivo* и/или in vitro стабильности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Поскольку домен с неупорядоченной структурой так таковой не обладает стабильной структурой и функцией, биологическая активность, опосредованная ADA2, предусмотренной в настоящем документе, по существу остается такой же. В других примерах, PAS последовательности, которые образуют домены с неупорядоченной конформацией, являются биологически инертными, особенно в отношении протеолиза в плазме крови, иммуногенности, изоэлектрической точки/электростатического поведения, связывания с рецепторами клеточной поверхности или интернализации, но при этом являются также биодеградируемыми, что дает им явные преимущества перед синтетическими полимерами, такими как PEG.

Неограничивающие примеры PAS последовательностей, формирующих неупорядоченную конформацию, включают аминокислотную последовательность, такую как ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO:312), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO:313), APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO:314), APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO:315), SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO:316), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO:317), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO:318) или любые их комбинации. Дополнительные примеры PAS последовательностей известны в данной области техники (смотрите, *например,* опубликованный патент США номер 2010/0292130 и международную опубликованную PCT заявку номер WO 2008/155134)

g. HAP последовательности

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, по меньшей мере, с

одним гетерологичным фрагментом, который представляет собой глицин-богатый гомо-аминокислотный полимер (HAP). HAP последовательность может включать повторяющуюся последовательность из остатков глицина, которая имеет в длину, по меньшей мере, 50 аминокислот, по меньшей мере, 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот. В одном из примеров, HAP последовательность способна удлинять время полужизни фрагмента, слитого или связанного с HAP последовательностью. Неограничивающие примеры HAP последовательностей включают, но не ограничиваясь ими, $(Gly)_n$ (SEQ ID NO:368), $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO:343) или $Ser(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 595), где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В одном из примеров, n представляет собой 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом примере, n представляет собой 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200.

h. XTEN последовательности

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, по меньшей мере, с одним гетерологичным фрагментом, который включает XTEN последовательность, полипептид или его фрагмент, варианта или производное. XTEN последовательность представляет собой удлиненную полипептидную последовательность с не встречающимися в природе, по существу не повторяющимися последовательностями, состоящими, в основном, из небольших гидрофильных аминокислот, при этом такая последовательность имеет либо низкую степень структурированности, либо не имеет вторичной или третичной структуры в физиологических условиях (Schellenberger *et al.* (2009) Nat Biotechnol. 27(12):1186-1190). Примером XTEN последовательность является неструктурированный рекомбинантный полипептид из 864 аминокислот (SEQ ID NO:373), который удлиняет время полужизни в плазме белка, слитого с этим фрагментом. В виде гетерологичного фрагмента, XTEN последовательности могут функционировать как удлиняющие время полужизни

фрагменты. Кроме того, XTEN последовательности могут обеспечивать желаемые свойства, включая улучшенные фармакокинетические параметры и растворимость, но не ограничиваясь этим. Например, конъюгация XTEN последовательности с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может обеспечить одно или несколько из следующих выгодных свойств: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень устойчивости к протеазам, низкая иммуногенность, пониженное связывание с рецепторами млекопитающих или увеличенные гидродинамические радиусы (или радиусы Стокса). В некоторых примерах, благодаря XTEN последовательностям могут быть улучшены фармакокинетические свойства, например, увеличено время полужизни *in vivo* или увеличена площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), в результате чего любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, задерживается *in vivo* и сохраняет активность аденозиндезаминазы в течение более длительного периода времени по сравнению с такой же ADA2 без XTEN гетерологичного фрагмента.

Примеры XTEN последовательностей, которые могут быть использованы в качестве гетерологичных фрагментов, конъюгированных с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают любые XTEN последовательности, описанные в патентах США номер 7,855,279 и 7,846,445, опубликованных патентах США номер 2009/0092582, 2010/0239554, 2010/0323956, 2011/0046060, 2011/0046061, 2011/0077199, 2011/0172146, 2012/0178691, 2013/0017997 или 2012/0263701 или международных опубликованных патентах номер WO 2010091122, WO 2010144502, WO 2010144508, WO 2011028228, WO 2011028229 или WO 2011028344, каждый из которых включен в настоящий документе посредством ссылки во всей своей полноте.

i. Трансферрин или его фрагменты

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, по меньшей мере, с одним гетерологичным фрагментом, который представляет собой трансферрин или его фрагмент. Любой трансферрин может быть конъюгирован с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Например, человеческий Tf

(Tf) дикого типа представляет собой белок длиной 679 аминокислот (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:320 и 324; учетные номера в GenBank NP_001054.1 и AAB22049.1; последовательность нуклеиновой кислоты приведена в SEQ ID NO:319 и 322-323, учетные номера в GenBank NM001063, M12530, XM039845 и S95936), с молекулярной массой приблизительно 75 кДа (исключая гликозилирование), с двумя основными доменами, N-концевым доменом (примерно 330 аминокислот) и С-концевым доменом (примерно 340 аминокислот), которые, по всей видимости, являются следствием дупликации гена. N домен включает два субдомена, N1 домен и N2 домен, и С домен включает два субдомена, С1 домен и С2 домен.

В одном из примеров, трансферриновый гетерологичный фрагмент включает сплайс-вариант трансферрина. В одном из примеров, сплайс-вариант трансферрина может представлять собой сплайс-вариант человеческого трансферрина (SEQ ID NO:325; учетный номер в Genbank AAA61140). В другом примере, трансферриновая часть химерного белка включает один или несколько доменов последовательности трансферрина, *например,* N домен, С домен, N1 домен, N2 домен, С1 домен, С2 домен или любую их комбинацию.

j. Конъюгация с полимером

Конъюгат ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может включать ADA2, связанную, напрямую или не напрямую, по меньшей мере, с одним гетерологичным фрагментом, который представляет собой полимерную молекулу (полимер). Примерами полимеров являются полиолы (*т.е.,* поли-ОН), полиамины (*т.е.,* поли-NH_2) и поликарбоновые кислоты (*т.е.,* поли-СООН), а также гетерополимеры, *т.е.,* полимеры, содержащие одну или несколько разных связывающих групп, *например,* гидроксильные группы и аминогруппы. Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из полиалкиленоксидов (PAO), таких как полиалкиленгликоли (PAG), включая полиэтиленгликоли (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, метоксиполиэтиленгликоли (mPEG) и полипропиленгликоли, PEG-глицидиловые эфиры (Epox-PEG), PEG-оксикарбонилимидазол (CDI-PEG) разветвленные полиэтиленгликоли (PEG), поливиниловых спиртов (PVA), поликарбоксилатов, поливинилпирролидона,

полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поли-D,L-аминокислот, сополимер полиэтилена и малеинового ангидрида, сополимер полистирола и малеинового ангидрида, декстранов, включая карбоксиметилдекстраны, гепарина, гомологов альбумина, целлюлозы, включая метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиэтилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу, гидролизатов хитозана, крахмалов, таких как гидроксиэтилкрахмалы и гидроксипропилкрахмалы, гликогена, агарозы и ее производных, гуаровой камеди, пуллулана, инулина, ксантановой камеди, каррагенана, пектина, гидролизатов альгиновых кислот, био-полимера и полимерные молекулы, раскрытые в данной области техники, например, в патенте США номер 8,741,283 и международной опубликованной PCT заявке номер WO 2007/149686.

Например, полимер, конъюгированный с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, как правило, может соответствовать следующей формуле:

$[R—NH]_z$-(ADA2)

где (ADA2) является любой ADA2, описанной в настоящем документе, например, дикого типа, ее варианты или модифицированные формы;

NH— представляет собой аминогруппу аминокислоты в составе ADA2, предусмотренной в настоящем документе, к которой присоединяется полимер;

z представляет собой положительное целое число, например, от примерно 1 до примерно 32, или 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-1 1, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20, 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25, 24-26, 25-27, 26-28, 27-29, 28-30, 29-31 или 30-32;

R представляет собой по существу не антигенную полимерную молекулу, которая присоединена к ADA2, предусмотренной в настоящем документе, с возможностью удаления или без возможности удаления. Примерами неантигенных полимерных молекул могут быть любые описанные в настоящем документе и те, которые раскрыты в данной области технике, например, в патенте США номер 8 ,741,283 и международной опубликованной PCT заявке номер WO 2007/149686.

Например, любая ADA2, описанная в настоящем документе, может быть конъюгирована, по меньшей мере, с одной молекулой полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых примерах, полимер может быть водорастворимым. В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, конъюгирована с гетерологичным фрагментом PEG и также включает гетерологичный фрагмент, выбранный из константной области иммуноглобулина или ее части (*например,* Fc область), PAS последовательности, гидроксиэтилкрахмала (HES) и альбумина или его фрагмента или варианта, XTEN последовательности или любых их комбинаций.

Ковалентное или другое стабильное присоединение (конъюгация) полимерных молекул, таких как полиэтиленгликоль (фрагмент пегилирования (PEG)), к любому полипептиду ADA2, включая варианты полипептида ADA2, обеспечивает выгодные свойства полученно композиции ADA2-полимер. Такие свойства включают улучшенную биосовместимость, удлинение времени полужизни белка (и ферментативной активности) в плазме, клетках и/или в других тканях субъекта, эффективное экранирование белка от действия протеаз и гидролиза, улучшенное биораспределение, улучшение фармакокинетики и/или фармакодинамики, увеличение стабильности, снижение иммуногенности, пролонгированные/продолжительные эффекты от лечения у субъекта и повышение растворимости в виде (смотрите патент США номер 4,179,337).

i. Полиэтиленгликоль (PEG)

Полиэтиленгликоль (PEG) широко используется в биоматериалах, биотехнологии и медицине, главным образом потому, что PEG является биосовместимым, нетоксичным, растворимым в воде полимером, и, как правило, неимунногенным (Zhao and Harris, *ACS Symposium Series* 680: 458-72, 1997). В области доставки лекарств, производные PEG широко используются для ковалентного присоединения (т.е., "пегилирования") к белкам с целью уменьшения их иммуногенности, защиты от протеолиза и клиренса почками, и для повышения растворимости (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16:157-82, 1995). Аналогично, PEG присоединяется к низкомолекулярным, относительно гидрофобным лекарственным средствам для повышения их растворимости,

уменьшения токсичности и изменения биораспределения. Как правило, пегилированные лекарственные средства инъецируются в виде растворов.

Родственным применением является синтез перекрестно сшитых деградируемых PEG сетей или лекарственных форм для доставки лекарственного средства, поскольку большая часть химических процессов, используемых для создания деградируемых, растворимых носителей лекарственных средств, также может быть использована для создания деградируемых гелей (Sawhney *et al.*, *Macromolecules* 26: 581-87, 1993). Известно также, что межмакромолекулярные комплексы могут быть образованы смешиванием растворов двух комплементарных полимеров. Такие комплексы обычно стабилизированы за счет электростатических взаимодействий (полианион-поликатион) и/или водородных связей (поликислота-полиоснование) между вовлеченными полимерами, и/или за счет гидрофобных взаимодействий между полимерами в водном окружении (Krupers *et al.*, *Eur. Polym J.* 32:785-790, 1996). Например, смешивание растворов полиакриловой кислоты (PAAc) и полиэтиленоксида (PEO) в соответствующих условиях приводит к формированию комплексов основанных преимущественно на водородных связях. Диссоциацию этих комплексов в физиологических условиях использовали для доставки свободных лекарственных средств (*m.e.*, не-пегилированных). Кроме того, из гомополимеров и сополимеров образованы комплексы комплементарных полимеров.

Многочисленные реагенты для осуществления пегилирования были описаны в данной области техники. Такие реагенты включают N-гидроксисукцинимидил (NHS) активированный PEG, сукцинимидил mPEG, $mPEG_2$-N-гидроксисукцинимид, mPEG сукцинимидил альфа-метилбутаноат, mPEG сукцинимидил пропионат, mPEG сукцинимидил бутаноат, сукцинимидиловый эфир mPEG карбоксиметил 3-гидроксибутановой кислоты, гомобифункциональный PEG-сукцинимидил пропионат, гомобифункциональный PEG пропиональдегид, гомобифункциональный PEG бутиральдегид, PEG малеимид, PEG гидразид, p-нитрофенил-карбонат PEG, mPEG-бензотриазолкарбонат, пропиональдегид PEG, mPEG бутиральдегид, разветвленный $mPEG_2$ бутиральдегид, mPEG ацетил, mPEG пиперидон, mPEG

метилкетон, mPEG "без линкера" малеимид, mPEG винилсульфон, mPEG тиол, mPEG ортопиридилтиофир, mPEG ортопиридил дисульфид, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, винилсульфон PEG-NHS, акрилат PEG-NHS, флуоресцеин PEG-NHS и биотин PEG-NHS, но не ограничиваясь этим (смотрите, *например,* Monfardini *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese *et al.*, *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; US 5,672,662; US 5,932,462; US 6,495,659; US 6,737,505; US 4,002,531; US 4,179,337; US 5,122,614; US 5,324,844; US 5,446,090; US 5,612,460; US 5,643,575; US 5,766,581; US 5,795,569; US 5,808,096; US 5,900,461; US 5,919,455; US 5,985,263; US 5,990,237; US 6,113,906; US 6,214,966; US 6,258,351; US 6,340,742; US 6,413,507; US 6,420,339; US 6,437,025; US 6,448,369; US 6,461,802; US 6,828,401; US 6,858,736; US 8,741,283; US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; WO 05000360; US 2005/0114037; US 2005/0171328; US 2005/0209416; EP 1064951; EP 0822199; WO 01076640; WO 0002017; WO 0249673; WO 94/28024; и WO 01/87925).

В частности, полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG). Подходящие полимерные молекулы для присоединения к любому полипептиду ADA2, в том числе к вариантам полипептида ADA2, включают полиэтиленгликоль (PEG) и производные PEG, такие как метокси-полиэтиленгликоли (mPEG), PEG-глицидиловые эфиры (Epox-PEG), PEG-оксикарбонилимидазол (CDI-PEG), разветвленные PEG и полиэтиленоксид (PEO), но не ограничиваясь этим (смотрите, *например,* Roberts *et al.*, *Advanced Drug Delivery Review* (2002) 54: 459-476; Harris and Zalipsky, S (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al.*, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):125-136, 2000; Harris, (2003) *Nature Reviews Drug Discovery* 2:214-221; и Tsubery, (2004) *J Biol. Chem* 279(37):38118-24).

Молекулярная масса полимерного фрагмента, такого как PEG фрагмент, может, как правило, составлять от примерно 1 кДа до примерно 100 кДа. В некоторых вариантах воплощения полимерная молекула, конъюгированная с

белком, таким как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, имеет молекулярную массу, равную, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 кДа или более 1000 кДа. Полимерные фрагменты могут быть других размеров в зависимости от желаемого профиля (*например,* желаемая продолжительность замедленного высвобождения, эффекты, если они имеются, на биологическую активность, легкость в использовании, степень или отсутствие антигенности и другие известные эффекты полиэтиленгликоля на белок или аналоги).

Фрагмент PEG может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. В некоторых примерах, гетерологичный полимер представляет собой PEG с разветвленной структурой. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США номер 5,643,575; Morpurgo *et al.* (1996) Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72; Vorobjev *et al.* (1999) Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750; и Caliceti *et al.* (1999) Bioconjug. Chem. 10:638-646, каждый из которых включен в настоящий документе посредством ссылки во всей своей полноте.

Описано множество реакций для осуществления пегилирования, но те, которые в большинстве случаев используются для направленного пегилирования, требуют мягких условий реакции и не требуют масштабной последующей обработки для удаления токсичных катализаторов или побочных продуктов. Например, монометокси PEG (mPEG) имеет только один реакционоспособный концевой гидроксил, и поэтому его применение ограничивает некоторую гетерогенность полученной смеси продуктов PEG-белок. Активация гидроксильной группы на конце полимера, противоположном концевой метокси группе, обычно необходима для осуществления эффективного пегилирования белка, чтобы сделать дериватизированный PEG более восприимчивым к нуклеофильной атаке. Атакующим нуклеофилом обычно является эпсилон-аминогруппа остатка лизина, но другие амины также могут реагировать (*например,* N-концевой альфа-амин и кольцевые амины гистидина), если этому благоприятствуют локальные условия.

Более направленное присоединение возможно в белках, содержащих единственный лизин или цистеин. Остаток цистеина может реагировать с PEG-малеимидом для тиол-специфической модификации. Альтернативно, PEG гидразид можно вводить в реакцию с оксиленным периодатом белком и далее восстанавливать в присутствии $NaCNBH_3$. Конкретнее, пегилированные CMP сахара могут реагировать с белком в присутствии соответствующих гликозилтрансфераз. Альтернативно, пегилирование ADA2 может быть осуществлено для вариантов, содержащих замены на неприродные аминокислоты, которые дают возможность осуществить сайт-специфическую химическую конъюгацию по оптимизированным положениям в белке. Методы пегилирования могут быть применены, когда ряд полимерных молекул связаны с целевым полипептидом. Использование этого метода затрудняет распознавание иммунной системой эпитопов на поверхности полипептида, ответственных за образование антител, что приводит к снижению иммунного ответа. В случае полипептидов, введенных непосредственно в кровеносную систему организма человека для получения конкретного физиологического эффекта (*m.e.,* лекарственные препараты), типичным потенциальным иммунным ответом будет IgG и/или IgM ответ, тогда как полипептиды, которые вводятся путем ингаляции через дыхательную систему (*m.e.,* промышленные полипептиды) потенциально могут вызвать IgE ответ (*m.e.,* аллергический ответ). Одна из теорий, объясняющая снижение иммунного ответа, заключается в том, что полимерная молекула (полимерные молекулы) экранирует (экранируют) эпитоп (эпитопы) на поверхности полипептида, ответственный за иммунный ответ, ведущий к образованию антитела. Другая теория или, по меньшей мере, частичный фактор заключается в том, что чем выше молекулярная масса конъюгата, тем сильнее снижается иммунный ответ.

Как правило, для создания пегилированных полипептидов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, включая варианты полипептида ADA2, PEG фрагменты конъюгируют, посредством ковалентного присоединения, с полипептидами. Методы пегилирования включают использование специализированных линкеров и химических способов связывания (смотрите, *например,* Roberts *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476,

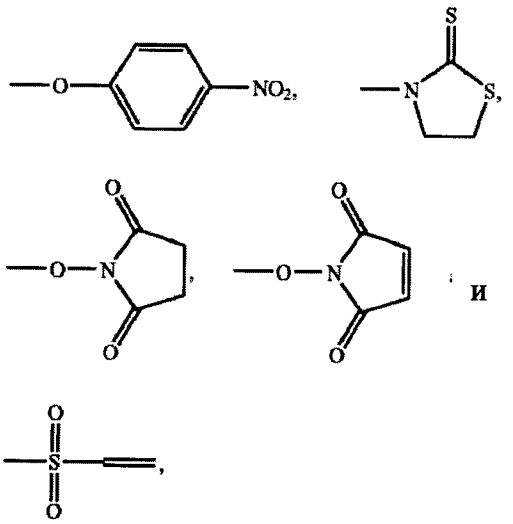
2002), присоединение множества PEG фрагментов к единственному сайту конъюгации (например, за счет использования разветвленных PEG; смотрите, *например,* Guiotto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-направленное пегилирование и/или моно-пегилирование (смотрите, *например,* Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999) и сайт-направленное ферментативное пегилирование (смотрите, *например,* Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002), но не ограничиваясь этим. С использованием способов и методов, описанных в данной области техники, могут быть получены белки, имеющие, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше 10 PEG или производных PEG, присоединенных к единственной молекуле белка (смотрите, *например,* U.S. 2006/0104968).

Число фрагментов полиэтиленгликоля, присоединенных к каждой молекуле ADA2, также может варьировать. Например, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть конъюгирована, в среднем, по меньшей мере, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 или большим числом молекул полиэтиленгликоля. Например, пегилированные полипептиды ADA2, в том числе варианты полипептида ADA2 обычно содержат, по меньшей мере, 5 PEG фрагментов на молекулу. В других примерах, число молекул PEG на молекулу белка может составлять 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-1 1, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20, 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25, 24-26, 25-27, 26-28, 27-29, 28-30, 29-31 или 30-32. Например, для полипептидов ADA2, в том числе вариантов полипептида ADA2, молярное соотношение молекул PEG и белка находится в диапазоне между 32:1 и 1:1, например примерно или до 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 и 5:1. Число молекул PEG на белок можно варьировать, чтобы модифицировать физические и кинетические свойства комбинированного конъюгата, чтобы он соответствовал конкретной клинической ситуации, как это определено специалистом в данной области техники. Способы определения молярного соотношения молекул PEG и белка раскрыты в данной области техники, например, в Delgado *et al.* (1992) Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304).

Ковалентное присоединение PEG к лекарственному средству (называется "пегилирование") может быть осуществлено известными методами химического

синтеза. Например, пегилирование белка может быть осуществлено реакцией NHS-активированного PEG с белком в подходящих условиях реакции. Различные способы модифицирование полипептидов ковалентным присоединением (конъюгированием) PEG или производных PEG (*т.е.,*"пегилирование") известны в данной области техники (смотрите, *например,* U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; U.S. 2004/0235734; U.S. 2006/0104968). Ковалентное присоединение различных полимеров, таких как PEG или производные PEG, описано в U.S. 8,741,283.

Активированные полимеры и производные могут быть использованы для облегчения конъюгации полимера с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Активированные полимеры и производные содержат уходящую или активирующую группу, которая облегчает присоединение полимерной системы к аминогруппе в полипептиде, таком как ADA2, предусмотренная в настоящем документе. Например, активированными группами являются группы, которые способны реагировать с аминогруппой (нуклеофил) в любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, например, с эпсилон-аминогруппой лизина. Примеры активирующих групп включают:



или другие подходящие уходящие или активирующие группы, такие как N-гидроксибензотриазолил, галоген, N-гидроксифталимидил, имидазолил, O-

ацилмочевины, пентафторфенол, 2,4,6-трихлорфенол или другие подходящие уходящие группы, очевидные специалистам в данной области техники.

Примеры активированных PEG включают, например, раскрытые в данной области техники, например, в патентах США номер 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 и 5,808,096 (активированный сукцинимидилкарбонатом полиэтиленгликоль (SC-PEG) и родственные активированные PEG) и патенте США номер 5,349,001 (активированные циклическим имидтионом PEG). Реакции конъюгации, как правило, проводят в подходящем буфере с молярным избытком в несколько раз активированного PEG. В некоторых примерах, конъюгаты, включающие линейные PEG, такие как SC-PEG, могут содержать, в среднем, от примерно 1 до примерно 32 молекул PEG на молекулу белка. Следовательно, в таких случаях могут быть использованы молярные избытки в несколько сотен раз, *например,* от примерно 200 до примерно 1000 раз. В случае разветвленных полимеров и полимеров, присоединенных к ферменту, используемый молярный избыток будет меньше и его можно определить с помощью методов, известных в данной области техники.

В некоторых примерах используются активированные полимерные линкеры полимерных систем, основанных на удалении бензила или лактонизации триметилов, описанные в патентах США номер 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6,624,142 и 6,303,569. В других примерах конъюгацию любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, с полимером можно осуществить с использованием полимерных остатков бицина, описанных в данной области техники, например, в патентах США номер 7,122,189, 7,087,229 и 8,741,283. В других примерах, конъюгацию любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, с полимером можно осуществить с использованием разветвленных полимерных остатков, например, описанных в патентах США номер 5,681,567, 5,756,593, 5,643,575; 5,919,455, 6,113,906, 6,153,655, 6,395,266 и 6,638,499, 6,251,382, 6,824,766 и 8,741,283. В других примерах, конъюгацию любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, с полимером можно осуществить с использованием стерически затрудненного линкера на основе сложного эфира, такого как описанный в международной опубликованной PCT заявке номер WO 2008/034119. В некоторых примерах для создания уретановой

или амидной связи с белком, таким как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, используется активированный полиэтиленгликоль.

Способы получения полимеров, содержащих концевые карбоновые кислоты, с высокой чистотой описаны в данной области техники, например, в опубликованной заявке на патент США номер 2007/0173615. Способы включают сначала получение третичного алкилового эфир полиалкиленоксида с последующим превращением его в производное карбоновой кислоты. Первая стадия процесса получения карбоновой кислоты PAO включает образование промежуточного соединения, такого как трет-бутиловый эфир карбоновой кислоты полиалкиленоксида. Это промежуточное соединение образуется путем взаимодействия PAO с трет-бутилгалоацетатом в присутствии основания, такого как трет-бутоксид калия. После образования промежуточного соединения трет-бутилового эфира, производное карбоновой кислоты полиалкиленоксида может быть легко получено с чистотой, превышающей 92%, например, превышающей 97%, 99% или 99,5%.

В других примерах для получения конъюгатов с ADA2, предусмотренной в настоящем документе, могут быть использованы полимеры, имеющие концевую аминогруппу. Способы получения полимеров, содержащих концевые амины, с высокой чистотой описаны в данной области техники, например, в патентах США номер 7,868,131 и 7,569,657. Например, полимеры, содержащие азиды, реагируют с восстанавливающим агентом на основе фосфина, таким как трифенилфосфин, или восстанавливающим агентом на основе боргидрида щелочного металла, таким как $NaBH_4$. Альтернативно, полимеры, содержащие уходящие группы, реагируют с солями защищенных аминов, такими как калиевая соль метил-трет-бутилимидодикарбоната (KNMeBoc) или калиевая соль ди-трет-бутилимидодикарбоната ($KNBoc_2$) с последующим снятием защиты с защищенной аминогруппы. Чистота полимеров, содержащих концевые амины, полученных с помощью этих процессов, составляет примерно более 95%, например более 99%.

В некоторых примерах, PEG часть конъюгата полимера с ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть выбрана из:

J-O—$(CH_2CH_2O)_u$—

J-O—$(CH_2CH_2O)_u$—$CH_2C(O)$—O—,

J-O—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2NR—, и

J-O—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2SH—,

где u представляет собой степень полимеризации, *т.е.,* примерно от 10 до примерно 2300;

R выбран из водорода, C_{1-6} алкилов, C_{2-6} алкенилов, C_{2-6} алкинилов, C_{3-12} разветвленных алкилов, C_{3-8} циклоалкилов, C_{1-6} замещенных алкилов, C_{2-6} замещенных алкенилов, C_{2-6} замещенных алкинилов, C_{3-8} замещенных циклоалкилов, арил замещенных арилов, аралкилов, C_{1-6} гетероалкилов, замещенных C_{1-6} гетероалкилов, C_{1-6} алкокси, фенокси и C_{1-6} гетероалкокси, и

J представляет собой блокирующую группу, *т.е.,* группу, которая находится на конце полимера и, в некоторых аспектах, может быть выбрана из NH_2 (или $CH_2CH_2NH_2$), H, SH (или CH_2CH_2SH), CO_2H (или CH_2CO_2H), C_{1-6} алкилов, таких как метил, или других PEG концевых активирующих групп, известных в данной области.

Например, PEG часть полимера в составе конъюгата может быть выбрана из

CH_3—O—$(CH_2CH_2O)_u$—, CH_3—O—$(CH_2CH_2O)_u$—$CH_2C(O)$—O—,

CH_3—O—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2NH— и CH_3—O—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2SH—,

где u представляет собой положительное целое число, так что средняя общая молекулярная масса полимерной части находится в пределах от примерно 2 кДа до примерно 100 кДа.

В других примерах, PEG часть полимера в составе конъюгата с ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть выбрана из:

—Y_1—$(CH_2CH_2O)_u$—$CH_2CH_2Y_1$—,

—Y_1—$(CH_2CH_2O)_u$—$CH_2C(=Y_2)$—Y_1—,

—Y_1—$C(=Y_2)$—$(CH_2)a_1$—Y_3—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2—Y_3—$(CH_2)a_1$—$C(=Y_2)$—Y_1—,

—Y_1—$(CR_2R_3)a_2$—Y_3—$(CH_2)b_1$—O—$(CH_2CH_2O)b_1$—$(CH_2)b_1$—Y_3—$(CR_2R_3)a_2$—Y_1—,

—Y_1—$(CH_2CH_2O)_u$—CH_2CH_2—,

—Y_1—$(CH_2CH_2O)_u$—$CH_2C(=Y_2)$—,

$—C(=Y_2)—(CH_2)a_1—Y_3—(CH_2CH_2O)_u—CH_2CH_2—Y_3—(CH_2)a_1—C(=Y_2)—$, и

$—(CR_2R_3)a_2—Y_3—(CH_2)b_1—O—(CH_2CH_2O)_u—(CH_2)b_1—Y_3—(CR_2R_3)a_2—$,

где: Y_1 и Y_3 независимо представляют собой O, S, SO, SO_2, NR_4 или связь;

Y_2 представляет собой O, S или NR_5;

R_2-R_5 независимо выбраны из водорода, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, C_{3-19} разветвленного алкила, C_{3-8} циклоалкила, C_{1-6} замещенного алкила, C_{2-6} замещенного алкенила, C_{2-6} замещенного алкинила, C_{3-8} замещенного циклоалкила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, C_{1-6} гетероалкила, замещенного C_{1-6} гетероалкила, C_{1-6} алкокси, арилокси, C_{1-6} гетероалкокси, гетероарилокси, C_{2-6} алканоил, арилкарбонил, C_{2-6} алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, C_{2-6} алканоилокси, арилкарбонилокси, C_{2-6} замещенный алканоил, замещенный арилкарбонил, C_{2-6} замещенный алканоилокси, замещенный арилоксикарбонил, C_{2-6} замещенный алканоилокси и замещенный арилкарбонилокси;

a_1, a_2 и b_1 независимо представляет собой ноль или положительное целое число от 1 до 6, например, 0, 1 или 2; и

u представляет собой целое число примерно от 10 до примерно 2300.

В других примерах, PEG часть полимера в составе конъюгата с ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть функционализирована, например, следующим образом:

$—C(=Y_4)—(CH_2)_m—(CH_2CH_2O)_u—$,

$—C(=Y_4)—Y—(CH_2)_m—(CH_2CH_2O)_u—$,

$—C(=Y_4)—NR_2—(CH_2)_m—(CH_2CH_2O)_u—$,

$—CR_6R_7—(CH_2)_m—(CH_2CH_2O)_u—$

где: R_2, R_6 и R_7 независимо выбраны из H, C_{1-6} алкилов, арилов, замещенных арилов, аралкилов, гетероалкилов, замещенных гетероалкилов и замещенных C_{1-6} алкилов;

m представляет собой ноль или представляет собой положительное целое число, например, 1 или 2,

Y_4 представляет собой O или S; и

u представляет степень полимеризации.

В некоторых примерах, полимерные конъюгаты ADA2, предусмотренной в настоящем документе, могут быть быть получены способами, которые включают превращение «многоруких» PEG-OH или “звездчатых-PEG”, например, выпускаемых NOF Corp, Токио, Япония, в активированный подходящим образом полимер, с использованием методов активации, описанных в патентах США номер 5,122,614 или 5,808,096. В одном из примеров, «многорукие» полимеры могут содержать четыре или больше полимерных ветвей и предпочтительно четыре или восемь полимерных ветвей. В некоторых примерах четыре ветви PEG превращают в подходящие функциональные группы, такие как сукцинимидил карбонат (SC), для облегчения присоединения к полипептиду, такому как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе.

Полимерные конъюгаты, предусмотренные в настоящем документе, могут быть растворимы в воде при комнатной температуре. Неограничивающий список таких полимеров включает гомополимеры полиалкиленоксидов, такие как полиэтиленгликоль (PEG) или полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры.

В качестве примера иллюстративного способа получения пегилированных полипептидов ADA2, в том числе вариантов полипептидов ADA2, для конъюгации PEG фрагментов, как правило сукцинимидил PEG, использовались PEG альдегиды, сукцинимиды и карбонаты. Примеры сукцинимидил моноPEG (mPEG) реагентов включают mPEG-сукцинимидил пропионаты (mPEG-SPA), mPEG-сукцинимидил карбоксиметиловый сложный эфир (mPEG-SCM), mPEG-сукцинимидил бутаноаты (mPEG-SBA) и (для присоединения "разветвленных" PEG) mPEG2-N-гидроксилсукцинимид. Эти пегилированные сукцинимидиловые эфиры имеют разные по длине углеродные остовы между PEG группой и активированным кросслинкером, и либо одну, либо разветвленную PEG группу. Эти различия могут быть использованы, например, для обеспечения разной кинетики реакций и для того, чтобы потенциально ограничить сайты, доступные для присоединения PEG к ADA2 в

процессе конъюгации. Такие композиции пегилированной ADA2 могут быть легко очищены с выходом, по меньшей мере, примерно от 90% до примерно 100% пегилированных молекул ADA2, и будут по существу свободны от не пегилированной ADA2 (меньше 5% не пегилированной).

В одном из примеров, пегилирование включает конъюгацию mPEG-SCM, например, mPEG-SCM-20K (имеющего молекулярную массу примерно 20 кДа) или других сукцинимидил карбоксиметиловых эфиров производного PEG, с любым полипептидом ADA2, в том числе с вариантами полипептида ADA2. Сукцинимидил карбоксиметиловые эфиры производных PEG, такие как mPEG-SCM-20K, легко связываются с аминогруппами лизинов в белках или N-концевым амином в биологически активных молекулах. Например, в результате ковалентной конъюгации m-PEG-SCM-20K и ADA2 (в виде мономера имеет размер приблизительно 59 кДа) образуется стабильная амидная связь между ADA2 и mPEG. Как правило, mPEG-SCM-20K или другой PEG добавляется к любому полипептиду ADA2, в том числе к вариантам полипептида ADA2, в молярном соотношении PEG:полипептид, равном 15:1, в подходящем буфере, с последующей стерилизацией, *например,* путем стерилизующей фильтрации, и продолжительным конъюгированием, например, при перемешивании в течение ночи при 4°C в холодильной камере.

Другие способы связывания сукцинимидиловых эфиров PEG, в том числе производных бутановой кислоты, таких как mPEG-SBA-30K, с полипептидом известны в данной области техники (смотрите, *например,* U.S. 5,672,662; U.S. 6,737,505; U.S. 8,784,791; U.S. 2004/0235734 и U.S. 2005/0158273). Например, полипептид, такой как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть соединен с NHS-активированным производным PEG реакцией в боратном буфере (0,1 M, pH 8,0) в течение одного часа при 4°C. Полученный пегилированный белок может быть очищен путем ультрафильтрации. Альтернативно, пегилирование бычей щелочной фосфатазы может быть осуществлено смешиванием фосфатазы с mPEG-SBA в буфере, содержащем 0,2 M фосфат натрия и 0.5 M NaCl (pH 7,5) при 4°C в течение 30 минут. Непрореагировавший PEG может быть удален путем ультрафильтрации или с использованием колонок со смолой, таких как колонки со смолой Capto Phenyl

(GE Healthcare). В другом способе полипептид реагирует с mPEG-SBA в деионизированной воде, в которую добавляется триэтиламин для повышения pH до 7,2-9. Полученная смесь перемешивается при комнатной температуре в течение нескольких часов до полного пегилирования.

Как показано в настоящем документе, пегилирование варианта ADA2 может привести к снижению связывания с гепарином ADA2. Такое снижение связывания с гепарином может наблюдаться наряду со снижением связывания с гепарином в результате аминокислотной замены (аминокислотных замен). Таким образом, пегилирование ADA2 также улучшает фармакокинетические свойства ADA2, и пегилирование может быть использовано вместо или наряду с аминокислотной заменой (аминокислотными заменами) для ослабления связывания с гепарином.

ii. Гидроксиэтилкрахмал (HES)

В некоторых примерах, по меньшей мере, один гетерологичный фрагмент представляет собой полимер, *например,* гидроксиэтилкрахмал (HES) или его производное. Гидроксиэтилкрахмал (HES) представляет собой производное, встречающегося в природе амилопектина, которое расщепляется альфа-амилазой в организме. HES представляет собой замещенное производное углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации до 95% по массе. HES обладает полезными биологическими свойствами и используется в качестве агента для замещения объема крови и при гемодилюции в клиниках.

Амилопектин содержит глюкозные фрагменты, в которых в основной цепи присутствуют α-1,4-гликозидные связи, а в сайтах разветвления находятся α-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы в основном определяются типом гликозидных связей. Из-за разрывов α-1,4-гликозидной связи, образуются спиральные структуры с шестью мономерами глюкозы на виток. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера могут быть модифицированы путем замещения. Введение гидроксиэтильной группы может быть осуществлено путем щелочного гидроксиэтилирования. Если адаптировать условия реакции можно использовать различную реакционную способность соответствующей

гидроксигруппы в незамещенном мономере глюкозы в отношении гидроксиэтилирования. Специалист в данной области техники способен определить паттерн замещения. HES в основном характеризуется молекулярно-массовым распределением и степенью замещения (DS), которое относится к молярному соотношению замещения.

В одном из примеров гидроксиэтилкрахмал имеет среднюю молекулярную массу (среднюю массу) от примерно 1 до 300 кДа, от примерно 2 до 200 кДа, от примерно 3 до 100 кДа или от примерно 4 до 70 кДа. Гидроксиэтилкрахмал также может иметь молярную степень замещения (DS) от примерно 0,1 до 3, предпочтительно от 0,1 до 2, более предпочтительно от 0,1 до 0.9, предпочтительно от 0,1 до 0.8, и соотношение между C2:C6 замещением в диапазоне от 2 до 20 по отношению к гидроксиэтильным группам. Неограничивающие примеры HES, имеющего среднюю молекулярную массу, равную примерно 130 кДА, включают HES с DS от 0,2 до 0,8, например, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 или 0.8, и, в частности, с DS от 0.4 до 0.7, например, 0.4, 0.5, 0.6 или 0.7.

В одном из примеров, HES может иметь среднюю молекулярную массу, равную примерно 130 кДа, и представляет собой VOLUVEN® (Fresenius Kabi, Germany). VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, используемый, *например,* для замещения объема в случае терапевтических показаний для терапии и профилактики гиповолемии. Характеристики VOLUVEN® следующие: средняя молекулярная масса 130 ± 20 кДа, молярное замещение 0,4 и соотношение C2:C6, равное примерно 9:1. В других примерах диапазоны средней молекулярной массы гидроксиэтилкрахмала составляют, *например,* от 4 до 70 кДа или от 10 до 70 кДа или от 12 до 70 кДа или от 18 до 70 кДа или от 50 до 70 кДа или от 4 до 50 кДа или от 10 до 50 кДа или от 12 до 50 кДа или от 18 до 50 кДа или от 4 до 18 кДа или от 10 до 18 кДа или от 12 до 18 кДа или от 4 до 12 кДа или от 10 до 12 кДа или от 4 до 10 кДа. В других примерах средняя молекулярная масса используемого гидроксиэтилкрахмала находится в диапазоне от более чем 4 кДа до менее 70 кДа, например, примерно 10 кДа, или в диапазоне от 9 до 10 кДа или от 10 до 11 кДа или от 9 до 11 кДа, или примерно 12 кДа, или в диапазоне от 11 до 12 кДа) или от 12 до 13 кДа или

от 11 до 13 кДа, или примерно 18 кДа, или в диапазоне от 17 до 18 kDa или от 18 до 19 kDa или от 17 до 19 кДа, или примерно 30 кДа, или в диапазоне от 29 до 30, или от 30 до 31 кДа, или примерно 50 кДа, или в диапазоне от 49 до 50 кДа или от 50 до 51 кДа или от 49 до 51 кДа.

В некоторых примерах, гетерологичный фрагмент может представлять собой смесб гидроксиэтилкрахмалов с разными средними молекулярными массами и/или разными степенями замещения и/или разным соотношением C2:C6 замещений. Следовательно, могут быть использованы смеси гидроксиэтилкрахмалов с разными средними молекулярными массами и разными степенями замещения и разными соотношениями C2:C6 замещений, или с разными средними молекулярными массами и разными степенями замещений и таким же или примерно таким же соотношением C2:C6 замещений, или с разными средними молекулярными массами и такой же или примерно такой же степенью замещения и разными соотношениями C2:C6 замещений, или с такой же или примерно такой же средней молекулярной массой и разными степенями замещений и разным соотношением C2:C6 замещений, или с разными средними молекулярными массами и такой же или примерно такой же степенью замещения и таким же или примерно таким же соотношением C2:C6 замещений, или с такой же или примерно такой же средней молекулярной массой и разными степенями замещений и таким же или примерно таким же соотношением C2:C6 замещений, или с такой же или примерно такой же средней молекулярной массой и с такой же или примерно такой же степенью замещения и разными соотношениями C2:C6 замещений, или с примерной такой же средней молекулярной массой и примерно такой же степенью замещения и примерно таким же соотношением C2:C6 замещений.

iii. Полисиаловые кислоты (PSA)

В некоторых примерах, по меньшей мере, один гетерологичный фрагмент представляет собой полимер, *например,* полисиаловые кислоты (PSA) или их производное. Полисиаловые кислоты (PSA) представляют собой встречающиеся в природе неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, продуцируемые некоторыми бактериальными штаммами и в некоторых клетках млекопитающих (Roth J., *et al.* (1993) in Polysialic Acid: From Microbes to Man,

eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland), pp 335-348). Они могут продуцироваться с различной степенью полимеризации от примерно 80 или больше остатков сиаловых кислот до примерно 2, ограниченной кислотным гидролизом или расщеплением нейраминидазами или фракционированием природных бактериальных форм полимера.

Состав различных полисиаловых кислот также варьирует, так что существуют гомополимерные формы, *m.e.,* α-2,8-связанные полисиаловые кислоты капсульных полисахаридов *E. coli* штамма K1 и менингококков группы B, которые также были обнаружены на эмбриональной форме нейрональной молекулы клеточной адгезии (N-CAM). Гетерополимерные формы также существуют, например, чередующиеся α-2,8 α-2,9 полисиаловые кислоты *E. coli* штамма K92 и полисахариды группы C из *N. meningitidis*. Сиаловая кислота также может быть обнаружена в чередующихся сополимерах, содержащих мономеры, отличные от сиаловой кислоты, например, полисахариды группы W135 или группы Y из *N. meningitidis*. Полисиаловые кислоты имеют важные биологические функции, включая уклонение патогенных бактерий от иммунной системы и системы комплемента и регулирование глиальной адгезивности незрелых нейронов во время развития плода (полимер при этом имеет антиадгезивную функцию) (Cho and Troy, (1994) P.N.A.S. 91:11427-11431), хотя у млекопитающих не известны рецепторы к полисиаловым кислотам.

В других примерах используются α-2,8-связанные полисиаловые кислоты *E. coli* штамма K1, также известные как коломиновая кислота (разной длины). Различные способы присоединения или конъюгации полисиаловых кислот к полипептиду были описаны (смотрите, *например,* патент США номер 5,846,951; WO 01/87922 и US 2007/0191597, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

iv. Другие полимеры

В других примерах полимерный фрагмент для конъюгации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть выбран из одного или нескольких эффективно неантигенных материалов, таких как декстран, поливиниловые спирты, полимеры на основе углеводов, гидроксипропилметакриламид (HPMA), полиалкиленоксиды и/или их

сополимеры, в том числе другие полимеры, известные в данной области техники и/или описанные в патенте США номер 6,153,655. Специалист в данной области техники способен выбрать полимер с учетом целей применения, а также выбрать подходящие способы конъюгации.

2. Способы получения конъюгатов или белков слияния

Гетерологичные фрагменты могут быть конъюгированы напрямую или не напрямую с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Например, гетерологичные фрагменты могут быть конъюгированы посттрансляционно, после рекомбинантной продукции полипептида ADA2, путем непосредственного химического связывания или не напрямую, посредством линкера. В других примерах гетерологичные фрагменты, которые представляют собой белковые или полипептидные фрагменты, могут быть напрямую или не напрямую конъюгированы с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В одном из примеров белковые или полипептидные фрагменты могут быть напрямую связаны, например, в составе белка-слияния. В других примерах гетерологичный фрагмент конъюгирован не напрямую, посредством линкера. В других примерах гетерологичный фрагмент может быть присоединен посредством образования дисульфидных связей между тиольной группы в гетерологичном фрагменте и остатками цистеина в ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

Линкеры

Линкеры, или спейсеры, могут быть использованы для соединения гетерологичных фрагментов и полипептидов, таких как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе. Линкер относится к последовательности пептида или полипептида (*например,* последовательность синтетического пептида или полипептида), или к не пептидному линкеру, основная функция которых заключается в соединении двух фрагментов, таких как ADA2, предусмотренная в настоящем документе, и гетерологичный фрагмент. Линкеры можно использовать для поддержания структурной гибкости и других конформационных характеристик отдельных остатков или на уровне вторичной, третичной или четвертичной структуры доменов или фрагментов полипептидного конъюгата или белка слияния, чтобы поддерживать

функциональные свойства фрагментов. Линкеры также могут придавать дополнительные полезные свойства полипептидному конъюгату или белку слияния, такие как повышенная экспрессия белка в системах экспрессии млекопитающих, улучшенные биофизические свойства, такие как стабильность и растворимость, улучшенная очистка и обнаружение белка и/или увеличенная ферментативная активность. В некоторых примерах два или более линкеров могут быть связаны последовательно. Линкеры могут представлять собой пептидные линкеры, которые связывают белковый или полипептидный фрагмент с полипептидом ADA2. Другие примеры линкеров включают химические связывающие агенты и гетеробифункциональные связывающие агенты.

Когда между ADA2 и гетерологичным фрагментом присутствуют несколько линкеров, все линкеры могут быть одинаковыми или каждый линкер может быть разным. Обычно линкеры придают полипептидной молекуле гибкость. Линкеры, как правило, являются нерасщепляемыми; тем не менее, в некоторых примерах, расщепляемые линкеры могут быть желательны. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения линкер может содержать один или несколько сайтов расщепления протеазой, которые могут быть расположены внутри последовательности линкера или могут фланкировать линкер на любом из концов последовательности линкера.

Линкеры могут быть введены в последовательности полипептидов, таких как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, с использованием методов, известных в данной области техники (*например,* химическая конъюгация, рекомбинантные методы или пептидный синтез). Модификации могут быть подтверждены секвенированием ДНК. В некоторых примерах линкеры могут быть введены с использованием рекомбинантных методов. В других примерах линкеры могут быть введены с использованием твердофазного пептидного синтеза. В других примерах полипептид, такой как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может содержать одновременно один или несколько линкеров, которые были введены с использованием рекомбинантных методов, и одновременно один или несколько линкеров,

которые были введены с использованием твердофазного пептидного синтеза или способов химической конъюгации, известных в данной области техники.

i. Пептидные линкеры

Пептидные линкеры могут быть использованы для связывания гетерологичного фрагмента с полипептидом ADA2, предусмотренным в настоящем документе. В одном из примеров пептидные линкеры могут быть слиты с С-концом первого полипептида (*например,* полипептид ADA2) и N-концом второго полипептида (*например,* белковый или полипептидный гетерологичный фрагмент). Эта структура может повторяться множество раз, например, по меньшей мере, один, преимущественно 2, 3, 4 или больше полипептидов связаны с другим полипептидом посредством пептидных линкеров на своих соответствующих концах.

Например, две молекулы (*например,* полипептид ADA2 и гетерологичный фрагмент) могут быть расположены рядом в конструкции или разделены посредством полипептидного линкера, который содержит 1, 2, 3 или больше аминокислот. В некоторых примерах, пептидный линкер может содержать, по меньшей мере, две аминокислоты, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90 или, по меньшей мере, 100 аминокислот. В других примерах, пептидный линкер может содержать, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 400, по меньшей мере, 500, по меньшей мере, 600, по меньшей мере, 700, по меньшей мере, 800, по меньшей мере, 900 или, по меньшей мере, 1000 аминокислот. В некоторых примерах, пептидный линкер может содержать, по меньшей мере, примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Пептидный линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1 -20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000

аминокислот. Линкер имеет такую длину, что два вариабельных домена соединяются без значительных помех. Например, полипептидный линкер может иметь последовательность Z_1-X-Z_2, где Z_1 и Z_2 представляют собой полипептид ADA2 и гетерологичный фрагмент, соответственно, и где X представляет собой последовательность пептидного линкера. В другом примере полипептид имеет последовательность Z_1-X-Z_2(-X-Z)$_n$, где "n" представляет собой любое целое число, *т.е.,* обычно 1 или 2.

Как правило, пептидный линкер имеет достаточную длину, чтобы полипептид ADA2 и гетерологичный фрагмент сохраняли свои конформационные структуры и функции. Примеры пептидных линкеров включают, но не ограничиваясь этим: —Gly-Gly—, GGGG (SEQ ID NO:362), GGGGG (SEQ ID NO:360), GGGGS или (GGGGS)n (SEQ ID NO:343), SSSSG или (SSSSG)n (SEQ ID NO:344), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:345), GGSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:346), GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:347), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:348), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO:349), AlaAlaProAla или (AlaAlaProAla)n (SEQ ID NO:350), SGGSGGS (SEQ ID NO:363), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO:364), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:365), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:366), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:367), Ser(Gly_4Ser)$_n$ (SEQ ID NO: 595) или (Gly-Ser)$_n$ остатки с несколькими остатками Glu или Lys, распределенными по всей длине для увеличения растворимости, где n может представлять собой целое число от 1 до 20, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Другие примеры линкеров включают пептидные линкеры, соответствующие формуле [$(Gly)_x$-Ser_y]$_z$, где x представляет собой число от 1 до 4, y представляет собой 0 или 1, и z представляет собой число от 1 до 50. В других примерах пептидный линкер включает последовательность G_n, где n представляет собой целое число от 1 до 100. В другом примере последовательность пептидного линкера может быть $(GA)_n$ или $(GGS)_n$. Другие примеры линкеров включают:

(1) Gly_4Ser с NcoI концами (SEQ ID NO:351)

CCATGGGCGG CGGCGGCTCT GCCATGG

(2) $(Gly_4Ser)_2$ с NcoI концами (SEQ ID NO:352)

CCATGGGCGG CGGCGGCTCT GGCGGCGGCG GCTCTGCCAT GG

(3) $(Ser_4Gly)_4$ с NcoI концами (SEQ ID NO:353)

CCATGGCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCGC CATGG

(4) $(Ser_4Gly)_2$ с NcoI концами (SEQ ID NO:354)

CCATGGCCTC GTCGTCGTCG GGCTCGTCGT CGTCGGGCGC CATGG

Связывающие фрагменты описаны, например, в Huston *et al.* (1988) *PNAS* 85:5879-5883, Whitlow *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6:989-995, и Newton *et al.*, (1996) *Biochemistry* 35:545-553. Другие подходящие пептидные линкеры включают любые, описанные в патентах США номер 4,751,180 или 4,935,233, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Полинуклеотид, кодирующий желаемый пептидный линкер может быть вставлен между и в ту же самую рамку считывания, что и полинуклеотид, кодирующий любую ADA2, предусмотренную в настоящем документе, и белковый или полипептидный гетерологичный фрагмент, с использованием любых подходящих общепринятых методов. Связывающие фрагменты также могут включать производные и аналоги встречающихся в природе аминокислот, а также различные не встречающиеся в природе аминокислоты (D- или L-), гидрофобные или не гидрофобные, известные в данной области техники.

В некоторых примерах пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (*например,* природные или не встречающиеся в природе пептиды), содержащие аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, которые не связаны или генетически не слиты в природе. Например, пептидный линкер может включать не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (*например,* включающих мутации, такие как добавление, замена или делеция). В другом примере пептидный линкер может включать не встречающиеся в природе аминокислоты. В другом примере пептидный линкер может включать встречающиеся в природе аминокислоты, находящиеся в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В другом примере

пептидный линкер может включать встречающуюся в природе полипептидную последовательность.

ii. Гетеробифункциональные связывающие агенты

Связывание любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и гетерологичного фрагмента может быть прямым или не прямым. Например, связывание может быть осуществлено за счет химического связывания или связывание можно облегчить с помощью бифункциональных или гетеробифункциональных линкеров, таких как любые известные в данной области техники или предусмотренные в настоящем документе.

Различные гетеробифункциональные перекрестносвязывающие реагенты, которые используются для образования ковалентных связей между аминогруппами и тиольными группами и для введения тиольных групп в белки, известны специалистам в данной области техники (смотрите, *например,* PIERCE CATALOG, *ImmunoTechnology Catalog & Handbook,* 1992-1993, где описано получение и применение таких реагентов и приведены коммерческие источники таких реагентов; смотрите, также, *например,* Cumber *et al.* (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:397-401; Thorpe *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:5924-5931; Gordon *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad Sci.* 84:308-312; Walden *et al.* (1986) *J. Mol. Cell Immunol.* 2:191-197; Carlsson *et al.* (1978) *Biochem. J.* 173: 723-737; Mahan *et al.* (1987) *Anal. Biochem.* 162:163-170; Wawrzynczak *et al.* (1992) *Br. J. Cancer* 66:361-366; Fattom *et al.* (1992) *Infection & Immun.* 60:584-589). Эти реагенты могут быть использованы для образования ковалентных связей между N-концевой частью гетерологичного фрагмента и C-концевой частью ADA2, предусмотренной в настоящем документе, или между каждой из этих частей и линкером. Эти реагенты включают, но не ограничиваясь этим: N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP; дисульфидный линкер); сульфосукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (сульфо-LC-SPDP); сукцинимидилоксикарбонил-α-метил бензил тиосульфат (SMBT, стерически затрудненный дисульфатный линкер); сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио) пропионамидо]гексаноат (LC-SPDP); сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC); сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)бутират (SPDB; стерически затрудненный линкер с

дисульфидной связью); сульфосукцинимидил 2-(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамид) этил-1,3'-дитиопропионат (SAED); сульфо-сукцинимидил 7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетат (SAMCA); сульфосукцинимидил-6-[альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуамидо]-гексаноат (сульфо-LC-SMPT); 1,4-ди-[3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо]бутан (DPDPB); 4-сукцинимидилоксикарбонил-α-метил-α-(2-пиридилтио)толуол (SMPT, стерически затрудненный дисульфатный линкер); сульфосукцинимидил-6-[α-метил-α-(2-пиримидилдитио) толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-SMPT); m-малеимидобензоил-N-гидрокси-сукцинимидный сложный эфир (MBS); m-малеимидобензоил-N-hydroxусульфо-сукцинимидный сложный эфир (сульфо-MBS); N-сукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоат (SIAB; тиоэфировый линкер); сульфосукцинимидил-(4-иодацетил)аминобензоат (сульфо-SIAB); сукцинимидил-4-(p-малеимидофенил)бутират (SMPB); сульфосукцинимидил-4-(p-малеимидо-фенил)бутират (сульфо-SMPB); азидобензоил гидразид (ABH); малеимидо капроил (MC); малеимидо пропаноил (MP); сукцинимидил 4-(K-малеимидометил)-циклогексан-l-карбоксилат (SMCC); m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS); N-сукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоат (SIAB); и сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)-пропионамид гексаноат (LC-SPDP) (смотрите, *например,* патент США номер 7,375,078). Другие примеры линкеров включают линкеры, соответствующие формуле, но не ограничиваясь этим:

—$C(O)CH_2OCH_2C(O)$—;

—$C(O)CH_2NHCH_2C(O)$—;

—$C(O)CH_2SCH_2C(O)$—;

—$C(O)CH_2CH_2CH_2C(O)$—, и

—$C(O)CH_2CH_2C(O)$—.

Эти линкеры, например, могут быть использованы в комбинации с пептидными линкерами, например, теми, которые увеличивают гибкость или растворимость или обеспечивают или устраняют стерическое затруднение. Могут быть использованы любые другие линкеры, известные специалистам в данной области техники для связывания полипептидной молекулы с другой молекулой. Общие свойства заключаются в том, что полученная молекула

сохраняет функцию аденозиндезаминазы и стабильность белка. Для *in vivo* применения конъюгата ADA2 или белка слияния, обычно линкер должен быть биосовместим с введением животным, в том числе людям.

E. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОДИРУЮЩИХ ADA2 И ЕЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

Полипептиды любой ADA2, описанные в настоящем документе, в том числе их варианты или модифицированные формы, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники для очистки белка и экспрессии рекомбинантного белка. Полипептиды также могут быть синтезированы химическим путем. Модифицированные формы или варианты могут быть получены стандартными сметодами рекомбинантных ДНК из полипептида дикого типа. Например, любая ADA2, в том числе ее варианты или модифицированные формы, может быть получена из полипептида дикого типа с помощью сайт-направленного мутагенеза.

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды ADA2

Полипептиды могут быть клонированы или выделены любыми доступными способами, известными в данной области техники для клонирования и выделения молекул нуклеиновых кислот. Такие способы включают ПЦР амплификацию нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, в том числе, скрининг гибридизацией нуклеиновых кислот, антительный скрининг и скрининг по активности. Например, когда полипептиды получают рекомбинантными способами, может быть использован любой способ, известный специалистам в данной области техники для идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих желаемые гены. Любой способ, доступный в данной области техники, может быть использован для получения полноразмерной кДНК или части (*т.е.*, включающей кодируемую область целиком) кДНК или клона геномной ДНК, кодирующих полипептид ADA2, например, из клетки или ткани.

Способы амплификации нуклеиновых кислот могут быть использованы для выделения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый полипептид, в том числе, например, способы полимеразной цепной реакции

(PCR). Примеры таких способов включают использование термоциклера Perkin-Elmer Cetus и Taq полимеразы (Gene Amp, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Материал, содержащий нуклеиновую кислоту, может быть использован в качестве исходного материала, из которого может быть выделена желаемая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид. Например, в способах амплификации могут быть использованы препараты ДНК и мРНК, экстракты клеток, экстракты тканей, образцы биологических жидкостей (*например,* кровь, сыворотка, слюна), образцы из здоровых субъектов и/или субъектов, имеющих заболевание. Источник может быть из любых эукариотических видов, в том числе из позвоночных, млекопитающих, человека, свиньи, быка, кошки, птицы, лошади, собаки и других приматов, но не ограничиваясь этим. Библиотеки нуклеиновых кислот также могут быть использованы в качестве источника исходного материала. Праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать желаемый полипептид. Например, праймеры могут быть сконструированы, основываясь на экспрессируемой последовательности, из которой был получен желаемый полипептид. Праймеры также могут быть сконструированы, основываясь на обратной трансляции аминокислотной последовательности полипептида. При желании, для амплификации могут быть использованы вырожденные праймеры. Олигонуклеотидные праймеры, которые гибридизуются с последовательностями на 3' и 5'-концах желаемой последовательности, могут быть использованы в качестве праймеров для амплификации с помощью ПЦР последовательности из образца нуклеиновой кислоты. Праймеры могут быть использованы для амплификации полноразмерной ADA2. Молекулы нуклеиновых кислот, полученные амплификацией, могут быть секвенированы и таким образом можно подтвердить, что они кодируют желаемый полипептид.

Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид ADA2, могут быть синтезированы химически или могут быть получены полусинтетическим путем. Синтетически или полусинтетически полученная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать аминокислотную последовательность любой ADA2, такую как любая описанная в настоящем документе в Разделе С выше. Например, синтетически или полусинтетически

полученная молекула нуклеиновой кислоты может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей любую последовательность нуклеотидов, описанную в настоящем документе. Химически синтезированные молекулы нуклеиновых кислот могут соответствовать полноразмерному гену ADA2 дикого типа или его укороченной последовательности. Химический синтез гена может быть осуществлен любыми способами, известными в данной области техники, такими как отжиг химически синтезированных олигонуклеотидов. Сборка полусинтетического гена, например, способом сборки по Гибсону, также может быть использована для получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей любые полипептиды ADA2, в том числе варианты, описанные в настоящем документе.

Нуклеиновая кислота, кодирующая любые полипептиды ADA2, может представлять собой кодон-оптимизированную молекулу нуклеиновой кислоты, в которой кодоны оптимизированы для систем экспрессии, используемых для получения полипептида (т.е., кодоны, которые преимущественно встречаются в организме системы экспрессии, чаще встречаются в синтезированной нуклеиновой кислоте). Например, для получения полипептида в системе экспрессии *Escherichia coli*, кодоны для каждой аминокислоты могут быть оптимизированы таким образом, чтобы для каждой аминокислоты использовался наиболее предпочтительный кодон в *E. coli*.

Дополнительные нуклеотидные последовательности могут быть присоединены к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в том числе, линкерные последовательности, содержащие сайты эндонуклеаз рестрикции, для того, чтобы клонировать синтетический ген в вектор, например, вектор экспрессии белка или вектор, сконструированный для амплификации корового белка, кодируемого последовательностями ДНК. Более того, дополнительные нуклеотидные последовательности, определяющие функциональные элементы ДНК, могут быть функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Примеры таких последовательностей включают последовательности промоторов, сконструированные таким образом, чтобы способствовать внутриклеточной экспрессию белка, и последовательности секреции, например гетерологичные

сигнальные последовательности, сконструированные таким образом, чтобы способствовать секреции белка, но не ограничиваясь этим. Такие последовательности известны специалистам в данной области техники. Дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющие области связывания белка, также могут быть связаны с молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих фермент. Такие области включают последовательности остатков, которые способствуют или кодируют белки, которые способствуют обратному захвату фермента конкретными клетками-мишенями, или иным образом изменяют фармакокинетику продукта синтетического гена, но не ограничиваясь этим.

Кроме того, могут быть добавлены метки или другие фрагменты, например, для того, чтобы облегчить обнаружение или аффинную очистки полипептида. Например, дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющие эпитопную метку или другой обнаруживаемый маркер, также могут быть связаны с молекулами нуклеиновых кислот, кодирующих фермент. Примеры таких последовательностей включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие метку FLAG® или метку Strep.

Идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в соответствующий клонирующий вектор. Может быть использовано большое количество систем вектор-хозяин, известных в данной области техники. Возможные векторы включают плазмиды или модифицированные вирусы, но не ограничиваясь этим, но при этом векторная система должна быть совместима с используемой клеткой-хозяином. Такие векторы включают бактериофаги, такие как производные бактериофага лямбда, или плазмиды, такие как pCMV4, pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), pBR322, производные плазмиды pUC или векторы pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), но не ограничиваясь этим. Вставку в клонирующий вектор можно осуществить, например, лигированием фрагмента ДНК с комплементарными липкими концами клонирующего вектора. Вставку можно осуществить с использованием клонирующих векторов TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Если в клонирующем векторе отсутствуют комплементарные сайты рестрикции, используемые для фрагментации ДНК, концы молекул ДНК могут быть модифицированы ферментативным путем. Альтернативно, любой желаемый сайт можно получить лигированием последовательностей нуклеотидов (линкеров) с концами ДНК; эти лигированные линкеры могут содержать специфические олигонуклеотиды, синтезированные химическим путем и кодирующие последовательности узнавания эндонуклеаз рестрикции. В альтернативном способе расщепляемый вектор и ген белка могут быть модифицированы гомополимерными хвостами.

Рекомбинантные молекулы могут быть введены в клетки-хозяева посредством, например, трансформации, трансфекции, инфекции, электропорации и сонопорации, таким образом, что получается много копий последовательности гена. В определенных вариантах воплощения с помощью трансформации клеток-хозяев молекулами рекомбинантной ДНК, которые включают выделенный ген белка, кДНК или синтезированную последовательность ДНК, можно получить множество копий гена. Таким образом, ген можно получить в большом количестве, выращивая трансформанты, выделяя молекулы рекомбинантной ДНК из трансформантов и, при необходимости, извлекая вставленный ген из выделенной рекомбинантной ДНК.

В дополнение к рекомбинантной продукции любая ADA2, в том числе ее варианты или модифицированные формы, предусмотренные в настоящем документе, могут быть получены прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных методов (смотрите, *например,* Stewart *et al.* (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc.*, 85:2149-2154). Синтез белка *in vitro* можно осуществить ручными методами или с использованием автоматизированных устройств. Автоматизированный синтез можно осуществить, например, с использованием синтезатора пептидов Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) в соответствии с инструкциями, предусмотренными производителем. Различные фрагменты полипептида могут быть синтезированы отдельно химическим путем и скомбинированы химическими способами.

2. Получение мутантов или модифицированных нуклеиновых кислот и кодируемых полипептидов

Предусмотренные в настоящем документе модификации можно осуществить стандартными методами рекомбинантных ДНК, такими как обычные для специалистов в данной области техники. Любой способ, известный в данной области техники, может быть использован для осуществления мутации любой одной или нескольких аминокислот в целевом белке. Способы включают стандартный сайт-направленный мутагенез (с использованием, *например,* набора, такого как QuikChange, доступный из Stratagene) кодирующих молекул нуклеиновых кислот, или способы твердофазного полипептидного синтеза. Сайт-специфические вариации ADA2 дикого типа или любых вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, также могут быть введены во время химического синтеза гена или сборки полусинтетического гена, если эти способы используются для получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ADA2.

3. Векторы и клетки

Для рекомбинантной экспрессии одного или нескольких желаемых белков, таких как любые полипептиды ADA2, описанные в настоящем документе, нуклеиновая кислота, кодирующая всю или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, может быть вставлена в соответствующий экспрессионный вектор, *т.е.,* вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной последовательности, кодирующей белок. Необходимые транскрипционные и трансляционные сигналы также могут быть обеспечены за счет нативного промотора для генов ферментов и/или фланкирующих их областей.

Также предусмотрены векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент. Также предусмотрены клетки, содержащие векторы. Клетки включают эукариотические и прокариотические клетки, и векторы представляют собой любые векторы, подходящие для применения внастоящем документе.

Предусмотрены прокариотические и эукариотические клетки, в том числе эндотелиальные клетки, содержащие векторы. Такие клетки включают

бактериальные клетки, клетки дрожжей, клетки грибов, архей, растительные клетки, клетки насекомых и клетки животных. Эти клетки используются для получения белка путем выращивания описанных выше клеток в условиях, при которых кодируемый белок экспрессируется клеткой, и восстановления экспрессированного белка. Для целей настоящего документа, например, фермент может секретироваться в среду.

Предусмотрены векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, кодирующую любой полипептид ADA2 или его варианты, связанную с нативной или гетерологичной сигнальной последовательностью, а также множество копий такой последовательности нуклеотидов. Могут быть выбраны векторы для экспрессии белка-фермента в клетке или такие векторы, которые приводят к экспресси белка-фермента в виде секретируемого белка.

Любое разнообразие систем хозяин-вектор, хорошо известное специалистам в данной области, может быть использовано для экспрессии кодирующей белок последовательности. К ним относятся клеточные системы млекопитающих, инфицированные вирусом (*например*, вирусом осповакцины, аденовирусом и другими вирусами); клеточные системы насекомых, инфицированные вирусом (*например*, бакуловирусом); микроорганизмы, такие как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы; или бактерии, трансформированные бактериофагом, ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК, но не ограничиваясь этим. Экспрессионные элементы векторов различаются по силе и специфичности. В зависимости от используемой системы хозяин-вектор может быть использован любой подходящий элемент транскрипции и трансляции.

Любые способы, известные специалистам в данной области техники для вставки фрагментов ДНК в вектор,могут быть использованы для конструирования экспрессионных векторов, содержащих химерный ген с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции и кодирующими белок последовательностями. Эти способы могут включать *in vitro* методы рекомбинантных ДНК и синтетические методы и *in vivo* рекомбинантов (генетическая рекомбинация). Экспрессия последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок, или его домены, производные,

фрагменты или гомологи, может регулироваться второй последовательность нуклеиновой кислоты таким образом, что гены или их фрагменты экспрессируются в хозяине, трансформированном рекомбинантной молекулой ДНК (рекомбинантными молекулами ДНК). Например, экспрессия белков может контролироваться любым промотором/энхансером, известным в данной области техники. В определенном варианте воплощения промотор не является нативным для генов желаемого белка. Промоторы, которые могут быть использованы, включают ранний промотор SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)), промотор, содержащийся в 3'длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto *et al., Cell 22*:787-797 (1980)), промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:1441-1445 (1981)), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster *et al.*, *Nature 296*:39-42 (1982)); промоторы в составе прокариотических экспрессионных векторов, такие как промотор β-лактамазы (Jay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:5543 (1981)) или промотор *tac* (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80*:21-25 (1983); смотрите также "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in Scientific American *242*:74-94 (1980)); промоторы в составе экспрессионных векторов растений, которые включают промотор нопалин синтетазы (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature 303*:209-213 (1984)) или промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (Gardner *et al.*, *Nucleic Acids Res. 9*:2871 (1981)), и промотор фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature 310*:115-120 (1984)); промоторные элементы дрожжей и других грибов, такие как промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор форфоглицераткиназы, промотор щелочной фосфатазы, и нижеследующие области контроля транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift *et al.*, *Cell 38*:639-646 (1984); Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50*:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology 7*:425-515 (1987)); регуляторная область гена инсулина, которая активна в панкреатических бета-клетках (Hanahan *et al.*, *Nature 315*:115-122 (1985)), регуляторная область гена иммуноглобулина,

которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl *et al.*, *Cell 38*:647-658 (1984); Adams *et al.*, *Nature 318*:533-538 (1985); Alexander *et al.*, *Mol. Cell Biol. 7*:1436-1444 (1987)), регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в яичках, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder *et al.*, *Cell 45*:485-495 (1986)), регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert *et al.*, *Genes and Devel. 1*:268-276 (1987)), регуляторная область гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol. 5*:1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, *Science 235*:53-58 (1987)), регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey *et al.*, *Genes and Devel. 1*:161-171 (1987)), регуляторная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Magram *et al.*, *Nature 315*:338-340 (1985); Kollias *et al.*, *Cell 46*:89-94 (1986)), регуляторная область гена основного миелинового белка, которая активна в олигодендроцитах головного мозга (Readhead *et al.*, *Cell 48*:703-712 (1987)), регуляторная область легкой цепи-2 миозина, которая активна в скелетной мышце (Shani, *Nature 314*:283-286 (1985)) и регуляторная область гена гонадотропного релизинг-гормона, которая активна в гонадотропной доле гипоталамуса (Mason *et al.*, *Science 234*:1372-1378 (1986)), но не ограничиваясь этим.

В конкретном примере используют вектор, который содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновыми кислотами, кодирующими желаемый белок, или его домен, фрагмент, производное или гомолог, одну или несколько точек начала репликации и, необязательно, один или несколько селектируемых маркеров (*например*, ген устойчивости к антибиотикам). Примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E. coli* включают, например, экспрессионные векторы pQE (доступные из Qiagen, Valencia, CA). Векторы pQE позволяют размещать метку 6xHis либо на N-, либо на C-конце рекомбинантного белка. Такие плазмиды включают pQE32, pQE30 и pQE31, которые содержат сайты множественного клонирования для всех трех рамок считывания и обеспечивают экспрессию белков с N-концевой 6xHis меткой. Другие примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E. coli* включают, например, pD444-SR (DNA2.0, Menlo Park, CA), которые содержат промотор T5, индуцируемый изопропил β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG),

сильный сайт связывания рибосомы (RBS) и точку начала репликации из pUC. Другие примеры плазмидных векторов для трансформации клеток *E. coli* включают, например, экспрессионные векторы pET (смотрите, патент США номер 4,952,496; доступные из Novagen, Madison, WI; смотрите, также литературу, опубликованную Novagen, в которой описана эта система). Такие плазмиды включают pET11a, которая содержит промотор T7lac, терминатор T7, индуцибельный lac оператор *E. coli* и ген-репрессор lac; pET12a-c, которая содержит промотор T7, терминатор T7 и сигнал секреции ompT *E. coli*; и pET15b и pET19b (Novagen, Madison, WI), которые содержат лидерную последовательность His-Tag™ для очистки на колонке с His и сайт расщепления тромбином, который обеспечивает расщепление после очистки на колонке, промоторную область T7-lac и терминатор T7.

Примером вектора для экспрессии в клетках млекопитающих является экспрессионный вектор pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; номер по каталогу 212220). Вектор pCMV-Script получен из многокопийной плазмиды на основе pUC и содержит немедленно-ранний промотор человеческого цитомегаловируса (CMV) для конститутивной экспрессии клонированной вставки в большом разнообразии клеточных линий. Вектор содержит ДНК, кодирующую промотор β-лактамазы и ранний промотор SV40, связанный с геном устойчивости к неомицину/канамицину (neo/kan), точку начала репликации f1, немедленно-ранний промотор (CMV), SV40 поздний сигнал полиаденилирования (SV40) и полиА сигнал тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV). Другим примером экспрессионного вектора млекопитающих является экспрессионный векторHZ24, полученный из вектора pCI (Promega). Этот вектор содержит ДНК, кодирующую ген устойчивости бету-лактамазу (AmpR), точку начала репликации F1, немедленно-раннюю энхансерную/промоторную область цитомегаловируса (CMV) и SV40 поздний сигнал полиаденилирования (SV40). Экспрессионный вектор также имеет участок внутренней посадки рибосомы (IRES) из вируса ECMV (Clontech) и мышиный ген дигидрофолатредуктазы (DHFR).

Любые варианты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, также могут кодироваться в экспрессионных векторах для *in vivo* экспрессии, в

частности, в векторах для направленной доставки в опухоль или в онколитических векторах для экспрессии в опухолевых клетках. Векторы для *in vivo* экспрессии включают онколитические векторы для доставки в опухоли и экспрессии в них или для направленной доставки в другие клетки и ткани или векторы для генной терапии. Онколитические векторы для доставки включают вирусные векторы на основе вируса болезни Ньюкасла, парвовируса, вируса осповакцины, реовируса, вируса кори, вируса везикулярного стоматита (VSV), онколитических аденовирусов и вирусов герпеса. Онколитические вирусные векторы для направленной доставки хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, вирус везикулярного стоматита, смотрите, например, патенты США номер 7,731,974, 7,153,510, 6,653,103 и опубликованные заявки на патенты США номер 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 и европейские патенты номер 1385466, 1606411 и 1520175; вирус простого герпеса, смотрите, например, патенты США номер 7,897,146, 7731,952, 7,550,296, 7,537,924, 6,723,316, 6,428,968 и опубликованные заявки на патенты США номер 2011/0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894 и 20040009604; ретровирусы, смотрите, например, патенты США номер 6,689,871, 6,635,472, 6,639,139, 5,851,529, 5,716,826, 5,716,613 и опубликованную заявку на патент США номер 20110212530; и адено-ассоциированные вирусы, смотрите, например, патенты США номер 8,007,780, 7,968,340, 7,943,374, 7,906,111, 7,927,585, 7,811,814, 7,662,627, 7,241,447, 7,238,526, 7,172,893, 7,033,826, 7,001,765, 6,897,045 и 6,632,670. Векторы могут быть введены в клетки для клеточной терапии, такие как иммунные клетки для иммунотерапии, как описано в настоящем документе.

Векторы для направленной доставки любых вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, также могут кодировать дополнительные агенты, такие как агенты для комбинированной терапии, представляющие собой белки или полипептиды, например, другие иммуномодулирующие агенты, химиотерапевтические агенты, ингибиторы иммунных контрольных точек или деградирующий гиалуронан фермент, такой

как а растворимая гиалуронидаза или конъюгированная с полимером растворимая гиалуронидаза (*например,* PEGPH20). Например, помимо любых вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, деградирующие гиалуронан ферменты могут кодироваться экспрессионными векторами для *in vivo* экспрессии, в частности, для направленной доставки в опухоль или онколитическими векторами для экспрессии в опухолевых клетках (смотрите, *например,* патент США номер 8,450,470 и опубликованную заявку на патент США номер 2011/0152359; смотрите также опубликованную заявку на патент США номер 2012/0148535).

Иммунные клетки, которые кодируют и экспрессируют варианты ADA2, предусмотренные в настоящем документе

Любые модифицированные варианты аденозиндезаминазы 2 (ADA2), предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы в способах адоптивной иммунотерапии. Способы адоптивной иммунотерапии с использованием иммунных клеток, модифицированных для экспрессии терапевтического белка или другого белка, и необязательно других белков и рецепторов, которые усиливают иммунный ответ с целью преодоления иммуносупрессивного эффекта рака и/или для направленного действия иммунных клеток на конкретные клетки, хорошо известны специалистам в данной области техники. Соответственно, предусмотрены иммунные клетки, которые кодируют один или несколько вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, и необязательно дополнительные молекулы для усиления направленного действия на опухоль и иммунного ответа, в частности для преодоления иммуносупрессивного эффекта определенных опухолей. Иммунные клетки включают инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), цитотоксические Т лимфоциты (CTL), естественные киллеры (NK), активируемые лимфокинами клетки-киллеры (LAK) и иммунные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), но не ограничиваясь этим.

Способы иммунотерапии путем введения иммунных клеток, хорошо известны. Иммунные клетки, которые могут быть аутологичными или гетерологичными, но как правило являются аутологичными клетками, собирают

у подлежащего лечению субъекта, модифицируют для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей любой один или несколько вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, обрабатывают для удаления опухолевых клеток по мере необходимости и наращивают, если это необходимо. Нуклеиновая кислота может быть введена, например, в экспресионный вектор или в вектор или искусственную хромосому, что приводит к включению ДНК, кодирующей вариант (варианты) ADA2 в хромосому или хромосомы иммунных клеток. Иммунные клетки культивируют, наращивают и вводят субъекту, имеющему опухоль, для лечения. В некоторых вариантах воплощения иммунные клетки направленно действуют на опухолевые клетки. Например, в некоторых вариантах воплощения клетки кодируют вариант ADA2 и также экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). Клетки, содержащие CAR, направлены против конкретных опухолевых антигенов, и способы получения таких клеток известны специалистам в данной области техники (смотрите, *например,* международную опубликованную PCT заявку номер WO 2014/186469).

CAR хорошо известны, смотрите, *например,* любые международные опубликованные PCT заявки номер WO 2012/031744, WO 2012/079000, WO 2013/059593, WO 2015/112626, WO 2014/011988 и патент США номер 8,465,743, в которых описаны CAR и клетки, экспрессирующие их, а также их применения и улучшения; смотрите также опубликованную заявку на патент США номер US 20150064154, в которой описаны клетки и системы экспрессии для получения иммунных клеток для применения в клеточной терапии, которые направленно действуют на опухоли. Клетка может быть трансфицирована, трансдуцирована или иным образом модифицирована для экспрессии этих гетерологичных белков, используя стандартные способы, известные специалистам в данной области техники. CAR могут быть сконструированы таким образом, чтобы их мишенью был любой целевой антиген опухолевой клетки, в том числе HER2, CD19, HERV-K, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, NY- ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и GD2 и их комбинации, но не ограничиваясь этим. Примеры опухолевых антигенов, распознаваемых CAR известны специалистам в данной

области техники (смотрите, например, Renkvist *et al.* Cancer Immunol Immunother. 50(1):3-15 (2001) и Novelino *et al.* Cancer Immunol Immunother. 54(3):187-207 (2005)). Антигенсвязывающая область может включать, например, фрагмент VH и VL цепей одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, специфичного к антигену опухолевой клетки, или может включать множество антигенсвязывающих доменов человеческого антиген-специфического антитела. scFv, например, может быть связан с гибким трансмембранным доменом с иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (смотрите, *например,* Sadelain *et al.* Curr. Opin. Immunol. 21, 215-223 (2009)). CAR могут включать дополнительные активирующие домены из костимулирующих молекул, таких как CD28 и CD137 для повышения выживаемости и пролиферации Т-клеток. CAR и/или клетки, экспрессирующие CAR, могут также кодировать и экспрессировать костимулирующие сигнальные области, которые включают, например, внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, такой как внутриклеточный домен CD27, CD28, 4-lBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, функционально-связанный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83 и любой их комбинации.

В данной области известны различные конструкции CAR и векторы экспрессии для них. Экспрессионным вектором может быть вектор, который остается эписомным, или вектор, который приводит к включению нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR и/или вариант ADA2, в хромосому, например, путем гомологичной интеграции или путем включения последовательностей транспозонов, так что при наличии транспозазы кодирующая последовательность может интегрироваться в хромосому трансфицированной клетки. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариант ADA2 и CAR, может быть включена в тот же самый вектор или может быть включена в другие вектора. Если используется транспозон (транспозоны), клетки могут экспрессировать транспозазу для облегчения интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR и/или варианта ADA2 в хромосому трансфицированных клеток. Системы транспозонов известны (смотрите, *например,* международную опубликованную

PCT заявку номер WO 2014/186469). Транспозаза может быть предусмотрена в векторе экспрессии ДНК или в виде экспрессируемой РНК или белка для транзиентной экспрессии. Специалистам в данной области техники известны такие системы транспозонов, которые не требуют долгосрочной экспрессии транспозазы в трансгенных клетках. Любая система транспозазы может быть использована в соответствии с вариантами воплощения. В других аспектах клетки могут быть инфицированы лентивирусом для облегчения интеграции в геном клетки кодирующей последовательности CAR и последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариант ADA2.

4. Экспрессия

Любые полипептиды аденозиндезаминазы 2 (ADA2), в том числе варианты полипептидов ADA2, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, в том числе *in vivo* и *in vitro* способами. Желаемые белки могут быть экспрессированы в любом организме, подходящем для продукции нужных количеств и форм белков, например, количеств и форм, необходимых для введения и лечения. Хозяева для экспрессии включают прокариотические и эукариотические организмы, такие как *E.coli*, дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих, в том числе человеческие клеточные линии, и трансгенных животных. Хозяева для экспрессии могут различаться по уровню продукции белка, а также по типу посттрансляционных модификаций, присутствующих на экспрессированных белках. Хозяин для экспрессии может быть выбран на основе этих и других факторов, таких как соображения регуляции и безопасности, затраты на производство, необходимость очистки и способы очистки. Любой из вариантов ADA2, предусмотренных в настоящем документе, также может кодироваться экспресионными векторами для *in vivo* экспрессии, в частности, векторами для направленной доставки в опухоли или онколитическими векторами для экспрессии в опухолевых клетках.

Многие экспрессионные векторы доступны и известны специалистам в данной области и могут быть использованы для экспрессии белков. Выбор экспрессионного вектора будет зависеть от выбора системы экспрессии хозяина. В целом экспрессионные векторы могут включать промоторы транскрипции и,

необязательно, энхансеры, трансляционные сигналы и сигналы терминации транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, которые используются для стабильной трансформации, как правило, имеют селективный маркер, который позволяет отбирать и поддерживать трансформированные клетки. В некоторых случаях для увеличения числа копий вектора может быть использована точка начала репликации.

Полипептиды ADA2, в том чисое варианты полипептидов ADA2, также могут использоваться или экспрессироваться в виде белков слияния. Например, фермент слияния может быть получен для придания ферменту дополнительных функций. Примеры ферментов слияния включают ферменты, слитые с сигнальной последовательностью, меткой, такой как метка для локализации, *например,* His_6 метка или FLAG™ метка, или метка для очистки, например, белок слияния с GST, и последовательность для направления секреции белка и/или ассоциации с мембраной, но не ограничиваясь этим.

a. Прокариотические клетки

Прокариоты, особенно *E. coli*, обеспечивают систему для получения большого количества белков. Трансформация *E.coli* является простым и быстрым способом, хорошо известным специалистам в данной области. Экспрессионные векторы для *E.coli* могут содержать индуцируемые промоторы, такие промоторы могут быть использованы для индукции высоких уровней экспрессии белка и экспрессии белков, демонстрируют некоторую токсичность в клетках-хозяевах. Примеры индуцируемых промоторов включают lac-промотор, trp-промотор, гибридный tac промотор, промоторы T7 и SP6 РНК и регулируемый температурой промотор λPL.

Белки, такие как любые предусмотренные в настоящем документе, могут быть экспрессированы в цитоплазматической среде *E. coli*. Цитоплазма является восстанавливающей средой, и для некоторых молекул это может привести к образованию нерастворимых телец включения. Восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол и β-меркаптоэтанол и денатурирующие агенты, такие как гуанидин-HCl и мочевина могут быть использованы для ресолюбилизации белков. Альтернативный подход заключается в экспрессии белков в периплазматическом пространстве бактерий, которое обеспечивает

окислительную среду и наличие шаперонин-подобных белков и дисульфидизомераз, что приводит к образованию растворимого белка. Как правило, лидерную последовательность сливают с белком, который должен быть экспрессирован, и она направляет белок в периплазму. Лидерная последовательность затем удаляется сигнальными пептидазами внутри периплазмы. Примеры лидерных последовательностей, направляющих белки в периплазму, включают лидерную последовательность pelB из гена пектатлиазы и лидерную последовательность из гена щелочной фосфатазы. В некоторых случаях периплазматическая экспрессия допускает утечку экспрессированного белка в культуральную среду. Секреция белков обеспечивает быструю и простую очистку от культурального супернатанта. Белки, которые не секретируются, могут быть получены из периплазмы путём осмотического лизиса. Как и в случае цитоплазматической экспрессии, в некоторых случаях белки могут стать нерастворимыми, и могут быть использованы денатурирующие и восстанавливающие агенты для облегчения солюбилизации и рефолдинга. Температура индукции и роста также может влиять на уровни экспрессии и растворимость, как правило используется интервал температур между 25 °C и 37 °C. Как правило, бактерии продуцируют агликозилированные белки. Таким образом, если для функционирования белки должны быть гликозилированы, гликозилирование может быть добавлено *in vitro* после очистки из клеток-хозяев.

b. Дрожжевые клетки

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Pichia pastoris* являются хорошо известными дрожжевым системами экспрессии и могут быть использованы для получения белков, таких как любые, описанные в настоящем документе. Дрожжи могут быть трансформированы эписомными реплицируемыми векторами или с помощью стабильной хромосомной интеграции путем гомологичной рекомбинации. Как правило, для регуляции экспрессии генов используются индуцируемые промоторы. Примеры таких промоторов включают промоторы GAL1, GAL7 и GAL5 и промоторы металлотионеина, такие как CUP1, AOX1 или другие промоторы *Pichia* или других дрожжей.

Экспрессионные векторы часто включают селективный маркер, например LEU2, TRP1, HIS3 и URA3 для селекции и поддержания трансформированной ДНК. Белки, экспрессированные в дрожжах, часто являются растворимыми. Совместная экспрессия с шаперонинами, такими как Bip, и протеин-дисульфидизомеразой может повысить уровень экспрессии и растворимость. Кроме того, белки, экспрессированные в дрожжах, могут быть направлены на секрецию путем слияния с секреторным сигнальным пептидом, таким как секреторный сигнальный пептид фактора спаривания дрожжей типа альфа от *Saccharomyces cerevisae,* и слияния с белками поверхности дрожжевых клеток, такими как рецептор адгезии спаривания Aga2p или глюкоамилаза *Arxula adeninivorans*. Сайт протеолитического расщепления, например, для Kex-2 протеазы, может быть добавлен с целью удаления слитых последовательностей из экспрессированных полипептидов, когда они выходят из секреторного пути. Дрожжи также могут быть гликозилированы по мотивам Asn-X-Ser/Thr.

c. Клетки насекомых

Клетки насекомых, в частности, с использованием бакуловирусной экспрессии, используются для экспрессии полипептидов, таких как любые полипептиды ADA2 или варианты. Клетки насекомых экспрессируют высокие уровни белка и обеспечивают большинство посттрансляционных модификаций, используемых высшими эукариотами. Бакуловирусы имеют ограниченный круг хозяев, что может повысить безопасность и упростить ограничения, связанные с регуляцией, свойственные эукариотической экспрессии. В типичных экспрессионных векторах используется промотор, который обеспечивает высокий уровень экспрессии белка, такой как промотор полиэдрина бакуловируса. Часто используемые бакуловирусные системы включают такие бакуловирусы, как вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) и вирус ядерного полиэдроза *Bombyx mori* (BmNPV), и линии клеток насекомых, такие как Sf9, полученные из *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1). Для высокого уровня экспрессии нуклеотидная последовательность молекулы, которая должна быть экспрессирована, может быть вставлена непосредственно после инициаторного кодона полиэдрина вируса. Секреторные сигналы млекопитающих точно процессируются в клетках

насекомых и могут быть использованы для секреции экспрессированного белка в культуральную среду. Кроме того, линии клеток *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1) продуцируют белки с паттернами гликозилирования, аналогичными клеточным системам млекопитающих.

Альтернативной экспрессионной системой в клетках насекомых является использование стабильно трансформированных клеток. Для экспрессии могут быть использованы клеточные линии, такие как клетки Schneider 2 (S2) и Kc (*Drosophila melanogaster*) и клетки C7 (*Aedes albopictus*). Промотор металлотионеина *Drosophila* может быть использован для индукции высоких уровней экспрессии при наличии индукции тяжелыми металлами, такими как кадмий или медь. Экспрессионные векторы, как правило, поддерживают с помощью селективных маркеров, таких как неомицин и гигромицин.

d. Клетки млекопитающих

Системы экспрессии млекопитающих могут быть использованы для экспрессии белков, в том числе любых полипептидов ADA2, включая варианты полипептида ADA2. Экспрессионные конструкции могут быть доставлены в клетки млекопитающих путём вирусной инфекции, например, с помощью аденовируса, или путем прямого переноса ДНК с использованием липосом, фосфата кальция, DEAE-декстрана и физическими средствами, такими как электропорация и микроинъекция. Экспрессионные векторы для клеток млекопитающих, как правило, включают сайт кэпирования мРНК, TATA-бокс, последовательность инициации трансляции (консенсусная последовательность Козака) и элементы полиаденилирования. Также могут быть добавлены IRES элементы для обеспечения бицистронной экспрессии с другим геном, таким как селективный маркер. Такие векторы часто включают промоторы-энхансеры транскрипции для высокого уровня экспрессии, например промотор-энхансер SV40, промотор цитомегаловируса человека (CMV) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (RSV). Эти промоторы-энхансеры активны во многих типах клеток. Также для экспрессии могут быть использованы специфичные для тканей и клеток промоторные и энхансерные области. Примеры промоторных/энхансерных областей включают промоторные/энхансерные области гена эластазы I, инсулина, иммуноглобулина, вируса опухоли молочной

железы мыши, альбумина, альфа-фетопротеина, альфа-1-антитрипсина, бета-глобина, основного белка миелина, легкой цепи-2 миозина и гонадотропного релизинг-гормона, но не ограничиваясь этим. Для селекции и поддерживания клеток с экспрессионной конструкцией могут быть использованы селективные маркеры. Примеры селективных маркерных генов включают гигромицин B-фосфотрансферазу, аденозиндезаминазу, ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазыу, аминогликозидфосфотрансферазу, дигидрофолатредуктазу (DHFR) и тимидинкиназу, но не ограничиваясь этим. Например, экспрессия может быть осуществлена в присутствии метотрексата для отбора только тех клеток, которые экспрессируют ген DHFR. Слияние с сигнальными молекулами на поверхности клеток, такими как TCR-ζ и γ-$Fc_{\varepsilon}RI$, может направить экспрессию белков в активном состоянии на поверхность клетки.

Для экспрессии доступно множество клеточных линий млекопитающих, в том числе клетки мыши, крысы, человека, обезьяны, курицы и хомячка. Примеры клеточных линий включают CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, мышиные NS0 (несекретирующие) и другие клеточные линии миеломы, клеточные линии гибридомы и гетерогибридомы, лимфоциты, фибробласты, клетки Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 и HKB cells, но не ограничиваясь этим. Также доступны клеточные линии, адаптированные к бессывороточной среде, которая облегчает очистку секретируемых белков из клеточной культуральной среды. Примеры включают клетки CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, номер по каталогу 11619-012) клеточная линия EBNA-1 для бессывороточной среды (Pham *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* *84*:332-342 Также доступны клеточные линии, адаптированные для роста в специальной среде, оптимизированной для максимальной экспрессии. Например, клетки DG44 CHO адаптированы для роста в суспензионной культуре в среде с известным химическим составом, не содержащей животных продуктов.

e. Растения

Трансгенные растительные клетки и растения могут быть использованы для экспрессии белков, таких как любые описанные в настоящем документе. Экспрессионные конструкции, как правило, переносят в растения с

использованием как прямого переноса ДНК, например, бс помощью омбардировки микрочастицами и PEG-опосредованного переноса в протопласты, так и агробактериальной трансформации. Экспрессионные векторы могут включать последовательности промотора и энхансера, элементы терминации транскрипции и регуляторные трансляционные элементы. Экспрессионные векторы и методы трансформации, как правило, различаются для двудольных хозяев, таких как *Arabidopsis* и табак, и однодольных хозяев, таких как кукуруза и рис. Примеры промоторов растений, используемых для экспрессии, включают промотор вируса мозаики цветной капусты, промотор нопалинсинтазы, промотор рибулозабисфосфаткарбоксилазы и промоторы убиквитина и UBQ3. Чтобы облегчить селекцию и поддержание трансформированных клеток, часто используют селективные маркеры, такие как гигромицин, фосфоманнозоизомераза и неомицинфосфотрансфераза. Трансформированные растительные клетки могут поддерживаться в культуре в виде клеток, агрегатов (каллусной ткани) или их можно регенерировать в целое растение. Трансгенные растительные клетки могут также включать генноинженерные водоросли для получения любых полипептидов ADA2. Поскольку растения имеют иные паттерны гликозилирования по сравнению с клетками млекопитающих, это может влиять на выбор белка, продуцируемого в этих хозяевах.

5. Методы очистки

Способ очистки полипептидов, в том числе любых полипептидов ADA2, включая варианты полипептидов ADA2, из клеток-хозяев будут зависеть от выбранных клеток-хозяев и систем экспрессии. В случае секретируемых молекул белки обычно очищают из культуральной среды после удаления клеток. В случае внутриклеточной экспрессии клетки могут быть лизированы, а белки очищены от экстракта. Когда для экспрессии используются трансгенные организмы, такие как трансгенные растения и животные, в качестве исходного материала могут быть использованы ткани или органы для получения экстракта лизированных клеток. Кроме того, продукция в трансгенном животном может включать продукцию полипептидов в молоке или яйцах, которые могут быть собраны, и, если необходимо, белки из них могут быть экстрагированы и

дополнительно очищены с использованием стандартных способов в данной области.

Белки, такие как полипептиды ADA2, могут быть очищены с использованием стандартных методов очистки белков, известных в данной области, включая SDS-PAGE, фракционирование по размеру и эксклюзионную хроматографию, осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию, такую как анионообменная хроматография, но не ограничиваясь этим. Методы аффинной очистки также могут быть использованы для повышения эффективности и чистоты препаратов. Например, антитела, рецепторы и другие молекулы, которые связываются с ферментами ADA2, могут быть использованы для аффинной очистки. Экспрессионные конструкции также могут быть сконструированы таким образом, чтобы добавлять аффинную метку к белку, например, эпитоп FLAG™, GST или His_6, и далее очищать белки с помощью антитела против FLAG™, смолы с глутатионом и Ni-смолы, соответственно.

Когда белки экспрессируются трансформированными бактериями в большом количестве, как правило, после индукции промотора, хотя экспрессия может быть конститутивной, полипептиды могут образовывать нерастворимые агрегаты. Существует несколько протоколов, пригодных для очистки полипептидных телец включения, известных специалисту в данной области техники. Многочисленные вариации будут очевидны специалистам в данной области техники. Например, в одном из способов клеточная суспензия, как правило, центрифугируется и осадок, содержащий тельца включения, ресуспендируется в буфере, который не растворяет, а отмывает от телец включения, например, 20 мМ Трис-HCl (pH 7,2), 1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl и 2% Triton-X 100, неионный детергент. Этап отмывки в некоторых случаях можно повторить, чтобы удалить как можно больше клеточного дебриса. Оставшийся осадок телец включения можно ресуспендировать в соответствующем буфере (например, 20 мМ фосфат натрия, pH 6,8, 150 мМ NaCl). Другие подходящие буферы очевидны для специалистов в данной области техники.

Альтернативно, белки могут быть очищены от периплазмы бактерий. В случаях, когда белок экспортируется в периплазму бактерий,

периплазматическая фракция бактерий может быть выделена с помощью холодного осмотического шока помимо других способов, известных специалистам в данной области. Например, в одном из способов, чтобы выделить рекомбинантные полипептиды из периплазмы, бактериальные клетки центрифугируют до образования осадка. Осадок можно ресуспендировать в подходящем буфере, содержащем 20% сахарозы. Чтобы лизировать клетки, бактерии можно центрифугировать и осадок ресуспендировать в охлажденном на льду 5 мМ $MgSO_4$ и выдержать на ледяной бане в течение приблизительно 10 минут. Суспензию клеток центрифугируют и супернатант декантируют и сохраняют. Рекомбинантные белки, присутствующие в супернатанте, могут быть отделены от белков хозяев стандартными методами разделения, хорошо известными специалистам в данной области, такими как описанные в настоящем документе методы разделения. Эти способы включают следующие стадии: фракционирование по растворимости, дифференциальную фильтрацию по размеру и колоночную хроматографию, но не ограничиваясь этим.

Молекулы белков ADA2, имеющие молекулярную массу от или примерно от 95 кДа до 120 кДа и обычно от или примерно от 100 кДа до 110 кДа, включительно, могут быть собраны и очищены. В мономерной форме или при оценке в восстанавливающих условиях с помощью SDS PAG, молекулярная масса ADA2 обычно составляет от или примерно от 50 кДа до 60 кДа, например, обычно от или примерно от 57 кДа до 59 кДа. Понятно, что варианты или другие модифицированные формы могут демонстрировать более высокие или более низкие молекулярные массы. Например, как правило, гипергликозилированные варианты или конъюгаты, предусмотренные в настоящем документе, могут иметь более высокие молекулярные массы.

Чистоту можно оценить любым способом, известным в данной области техники, включая гель-электрофорез, окрашивание и спектрофотометрические методы. Любые полипептиды ADA2, в том числе варианты полипептида ADA2, могут быть очищены до чистоты 60%, 70%, 80% и, как правило, по меньшей мере, до чистоты 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98% или 99%. Чистоту можно оценить стандартными способами, такими как SDS-PAGE и окрашивание Кумасси.

F. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ADA2

Анализы могут быть использованы для оценки физических свойств, стабильности и/или активности любых молекул белков ADA2, предусмотренных в настоящем документе, включая ADA2 дикого типа и ее варианты и модифицированные формы. Свойства и активности могут быть связаны с биологической активностью и/или с противоопухолевыми активностями. Анализы могут быть осуществлены *in vitro* или *in vivo*. Например, анализы могут быть использованы для оценки активности аденозиндезаминазы ADA2, связывания с гепарином, термостабильности, оптимума pH, фармакокинетики, активности ингибирования роста опухоли и других активностей и свойств. В другом примере анализы могут быть использованы для оценки влияния введения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включая влияние дозы и способа введения. Анализы также могут быть использованы для внесения незначительных корректировок в лекарственные формы, предусмотренные в настоящем документе, при сохранении активности ADA2 для терапевтического. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области. Неограничивающие примеры анализов описаны в нижеследующих подразделах.

1. Анализы активности аденозиндезаминазы

Активность аденозиндезаминазы (ADA; EC 3.5.4.4) любой ADA2, описанной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианта или конъюгата, можно оценить, используя способы, известные в данной области техники. В анализах активности ADA обычно измеряют, напрямую или не напрямую, скорость образования продукта ферментативной реакции. Например, образование инозина или аммония может быть измерено напрямую или не напрямую. В других примерах измеряется уменьшение субстрата фермента, *например,* аденозина или 2-дезоксиаденозина. Уменьшение субстрата или увеличение продукта может быть измерено с помощью спектрофотометрии или не напрямую с помощью последовательных ферментативных или окислительно-восстановительных реакций, в которых используются хромогенные субстраты или изменяются спектры поглощения реакции.

Например, в некоторых коммерчески доступных анализах аденозиндезаминазы (ADA), таких как наборы для анализа ADA, доступные из BQ Kits (San Diego, CA; номер по каталогу BQ014EALD) и Diazyme (Poway, CA; номер по каталогу DZ117A-K), используются колориметрический субстрат и спектрофотометрическая детекция для определения превращения аденозина в инозин ферментами ADA. В этих анализах образование инозина детектируется с помощью многоступенчатых ферментативных реакций, в результате которых образуется хромогенный краситель. В результате ферментативного дезаминирования аденозина образуется инозин, который превращается в гипоксантин под действием инозин-специфической пурин-нуклеозидфосфорилазы (PNP; EC 2.4.2.1), присутствующей в реакции. Гипоксантин далее превращается в мочевую кислоту и перекись водорода (H_2O_2) под действием ксантиноксидазы (XOD; EC 1.1.3.22). H_2O_2 далее реагирует с N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином (EHSPT) и 4-аминоантипирином (4-AA) в присутствии пероксидазы (POD) с образованием хинонового красителя, детекция которого осуществляется кинетическим способом с использованием УФ спектрофотометра при 556 нм. Аденозиндезаминаза из печени быков может быть использована в качестве стандарта. Измеряется изменение поглощения при 556 нм (ΔA_{556}) с течением времени, при 37 °C. Одна единица ADA представляет собой количество ADA, которое необходимо для образования одного мкмоля инозина из аденозина в минуту при 37°C. Активность аденозиндезаминазы в мЕд/мл рассчитывается по следующей формуле:

$$1\ \text{мЕд/мл} = (\Delta A_{556}/\text{мин} \times T_v) / (S_v \times \varepsilon \times l)$$

где T_v = общий объем реакции; S_v = объем образца, $\varepsilon = 32{,}2 \times 10^{-3}$ мкМ$^{-1}$см$^{-1}$, $l = 0{,}5$ см.

Активность ADA может быть визуализирована с использованием других колориметрических способов (смотрите, *например,* Manchenko, G.P., Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, CRC Press, pp. 453-454). Например, H_2O_2, образующаяся в анализе ADA, описанном выше, может быть визуализирована путем добавления феназинметосульфата (PMS), который превращается в дигидроPMS под действием H_2O_2, далее под действием

дигидроPMS нитросиний тетразолий хлорид (NBT) превращается в формазан. Поглощение формазана можно определить при 570 нм.

Другой способ измерения активности ADA заключается в измерении высвобождении аммония из аденозина при его дезаминировании до инозина. Высвобождение аммония может быть измерено с использованием коммерчески доступных наборов, таких как набор для анализа аммония Ammonia Assay kit (номер по каталогу A0853, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Набор содержит сухие реагенты, содержащие α-кетоглутаровую кислоту и NADPH. Аммоний реагирует с α-кетоглутаровой кислотой (KGA) и восстановленным никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (NADPH) в присутствии L-глутаматдегидрогеназы (GDH; номер по каталогу G2294, Sigma-Aldrich). Снижение поглощения при 340 нм вследствие окисления NADPH до NADP + пропорционально концентрации аммония и, следовательно, активности аденозиндезаминазы. Снижение абсорбции можно измерить с помощью спектрофотометра. Активность аденозиндезаминазы в мЕд/мл (эквивалентно мкМ/мин) рассчитывается по следующей формуле:

$$1 \text{ мЕд/мл} = (\Delta A/\text{мин} \times T_v) / (S_v \times \varepsilon \times l)$$

где T_v = общий объем реакции; S_v = объем образца, $\varepsilon = 6{,}22 \times 10^{-3}$ мкМ$^{-1}$см$^{-1}$, $l = 1$ см.

Другие анализы аденозиндезаминазы на основе спектрофотометрии включают непрерывный оптический анализ, который непосредственно измеряет изменения в поглощении аденозина. Поглощение аденозина можно измерять при 265 нм, и с течением времени можно измерять уменьшение поглощения при 265 нм вследствие дезаминирования аденозина до инозина. Образцы готовят в 100 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5 при 25 °C, содержащем 0,1% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубируют с 1,35 мМ раствором аденозина с pH 7,0 при 25 °C. Снижение поглощения при 265 нм (ΔA_{265}) измеряют приблизительно в течение 5 минут. В этом анализе активность ADA в Ед/мл рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Единиц/мл фермента} = (\Delta A_{265}/\text{мин})(T_v)(df))/(8{,}1)(V_E)$$

где T_v = общий объем (в мл) анализа; df = фактор разбавления; 8,1 = миллимолярный коэффициент экстинкции аденозина при 265 нм; V_E = объем (в миллилитрах) используемого фермента.

Одна единица фермента дезаминирует 1,0 мкмоль аденозина до инозина в минуту при pH 7,5 и температуре 25 °C. Такой способ может быть осуществлен в более крупном масштабе, например, в 96-луночном микротитровальном планшете (смотрите, например, Lu *et al.* (2012) Clinica Chimica Acta 413:1637–1640).

Может быть использован вариант этого способа, включающий необходимые поправки на измерение поглощения. Пик УФ поглощения аденозина и инозина приходится на 261 нм и 249 нм, соответственно, и их спектры поглощения сильно перекрываются. В ходе реакции дезаминирования поглощение аденозина уменьшается, тогда как поглощение инозина увеличивается с течением времени. Для определения относительного аденозина, спектр которого перекрывается со спектром инозина, осуществляют два спектрофотометрических измерения. Изобестическая точка, в которой аденозин и инозин имеют одинаковый коэффициент экстинкции, является постоянной величиной, равной 253 нм и не зависящей от концентрации. Изобестическую точку также измеряют в качестве контрольной точки для корректировки различий в объеме или интенсивности. Соотношение поглощение при 261 нМ/поглощение при 253 нМ (A_{261}/A_{253}) используется для измерения изменений в концентрации аденозина, основываясь на стандартной кривой.

2. Способы оценки связывания гепарина

Связывание гепарина или связывание другого GAG любой ADA2, описанной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантом или конъюгатом, можно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области. Эти способы и другие способы, известные в данной области техники для оценки связывания с GAG, могут быть использованы для оценки связывания и/или выбора вариантов ADA2 с измененным связыванием с гепарином, *например*, ослабленным связыванием с гепарином или увеличенным связыванием с гепарином. Как правило, на связывание с гепарином влияет присутствие ионов металлов, мочевины и детергентов (анионных, неионных и

цвиттерионных). Ca^{2+} и Mg^{2+} и цвиттерионный детергент 3-[(3-холамидопропил) диэтиламмонио]-1-пропансульфонат увеличивают связывание гепарина. Присутствие NaCl, мочевины, додецилсульфата натрия и La^{3+} уменьшает связывание с гепарином.

a. Анализ аффинности

Способность ADA2 связывать гепарин можно оценить с использованием анализов аффинности связывания с иммобилизованным гепарином. Гепарин представляет собой сильно сульфатированный гликозаминогликан и широко используется в качестве обычного аффинного лиганда. Из-за высокой степени сульфатирования молекула имеет сильно кислую природу, следовательно она связывается со многими веществами, в том числе ADA2, за счет ионных взаимодействий. Кроме того, гепарин содержит уникальные углеводные последовательности, которые являются специфическими сайтами связывания некоторых белков. Колонки, содержащие иммобилизованный гепарин, используются для оценки связывания и очистки белков с высокой аффинностью к гепарину, таких как ДНК-связывающие белки, факторы коагуляции, липопротеины и факторы синтеза белка. Например, коммерчески доступные колонки со смолой с гепарином, такие как HiTrap Heparin HP со смолой гепарин-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; номер по каталогу 17-0998-01), могут быть использованы для оценки связывания определенного белка, такого как ADA2. В смоле гепарин-Sepharose™, гепарин связан с основной матрицей Sepharose High Performance base matrix N-гидроксисукцинимидным способом связывания, что обеспечивает высокую емкость, производительность смолы и низкие уровни утечки.

Связывание с гепарином можно оценить путем анализа аффинности с использованием смолы гепарин-Sepharose™. В примере такого анализа 35 мкл ADA2, дикого типа или ее вариантов, смешивают с 20 мкл смолы гепарин-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; номер по каталогу 17-0998-01) и далее инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь далее центрифугируют через 0,22 мкМ центрифужный фильтр, и собирают проточную фракцию, содержащую не связавшийся белок для анализа в SDS-PAGE геле. 35 мкл 1,5 М NaCl добавляют к смоле гепарин-Sepharose и инкубируют при

комнатной температуре (RT) в течение 10 мин для элюции со смолы гепарин-Sepharose оставшегося связавшегося с гепарином белка. Степень связывания гепарина оценивается с помощью SDS-PAGE, путем сравнения количества ADA2, дикого типа и ее вариантов, связанного со смолой и в проточной фракции с количества ADA2 на входе.

b. ELISA анализ

Связывание гепарина с белком, таким как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, также можно оценить способами на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В способах на основе ELISA используется гепарин, иммобилизованный на поверхности, например, микротитрационного планшета. Целевой белок, который связывается с гепарином, такой как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, инкубируется в планшете, покрытом гепарином, и связывание детектируется с использованием антител для обнаружения целевого белка, такого как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе.

Например, для тестирования связывания ADA2 с гепарином может быть использован 96-луночный планшет, покрытый 100 мкл 200 мкг/мл натриевой соли гепарина (Calibochem, EMD Milipore, Billerica, MA; номер по каталогу 375095) в буфере Na_2CO_3 (pH 9,6). После связывания ADA2, такой как ADA2 дикого типа или ее варианты или модифицированные формы, лунки промывают и инкубируют с обнаруживающим антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), *например,* HRP-анти-FLAG антителом (Abcam, Cambridge, UK; номер по каталогу Ab1238), для обнаружения метки FLAG tag на целевом белке, таком как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе. После инкубации и отмывки, степень связывания целевого белка с иммобилизованным гепарином на планшете визуализируют с помощью хромогенного субстрата, например, для развития окраски добавляют раствор субстрата для HRP, 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (TMB) (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Оптическую плотность (OD) каждой реакции измеряют в планшетном ридере.

В другом примере гепарин иммобилизуют путем инкубации покрытых стрептавидином микротитрационных планшетов, таких как 96-луночный

планшет, покрытый стрептавидином (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; номер по каталогу 15520), с биотинилированным гепарином, таким как биотин-гепарин (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; номер по каталогу B9806-10MG). После связывания ADA2, дикого типа или ее вариантов или модифицированных форм, лунки промывают и инкубируют с обнаруживающим антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), *например,* HRP-анти-FLAG антителом (Abcam, Cambridge, UK; номер по каталогу Ab1238), для обнаружения метки FLAG tag на целевом белке, таком как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе. После инкубации и отмывки, степень связывания целевого белка с иммобилизованным гепарином на планшете визуализируют с помощью хромогенного субстрата, например, для развития окраски добавляют раствор субстрата для HRP, 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (TMB) (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Оптическую плотность (OD) каждой реакции измеряют в планшетном ридере.

Любые варианты этих способов, известные в данной области техники, также могут быть использованы. Например, специалист в данной области техники способен выбрать подходящую твердую подложку в зависимости от конкретных условий анализа, таких как конкретный pH. Микропланшеты, покрытые никелем, могут хуже подходить для связывания His-меченных белков, поскольку pH буфера может влиять на связывание антигена с покрытыми Ni, но слабо связывающими планшетами. Кроме того, для иммобилизации гепарина на планшете могут быть использованы различные способы, такие как конъюгация с бычьим сывороточным альбумином (BSA) или другим носителем, покрытым протамином сульфатом с избытком гепарина.

Буферы, блокирующие растворы и условия реакции также могут быть выбраны, основываясь на желаемом анализе связывания. Например, блокирующие растворы включают растворы, содержащие человеческий, бычий, лошадиный или другой сывороточный альбумин или желатин. Блокирование твердой подложки, такой как планшет, может быть осуществлено с использованием буфера для анализа связывания, к которому добавлены один или несколько блокирующих агентов. Примеры блокирующих агентов включают 1-5% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1-5% обезжиренного

сухого молока, 0,1-1% желатина и 25% сыворотки человека. Детергенты, такие как Tween-20, и консерванты, такие как тимеросал, могут быть добавлены к блокирующему раствору. Буферы для анализа связывания включают буфер, имитирующий опухолевое микроокружение, или нормальный физиологический буфер. Смесь водного раствора белка с твердой подложкой, как правило, инкубируют в течение 30 минут, 1 часа или дольше, период времени может варьировать в зависимости от температуры. Реакцию блокирования осуществляют при любой температуре и обычно проводят при 4° С-37° С, например, при 4° С, комнатной температуре (*т.е.,* 22° С) или 37°С. В некоторых примерах реакция протекает в течение, по меньшей мере, одного часа при температуре примерно 4°С-37°С. Например, блокирование может осуществляться при комнатной температуре в течение одного часа. После инкубации и блокирования полученную твердую фазу далее можно отмыть от не связавшегося белка до контакта с тестируемой молекулой (*например*, ADA2 дикого типа, ее вариантами и модифицированными формами, предусмотренными в настоящем документе).

Примеры ферментных меток включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и β-D-галактозидазу. Примеры субстратов ферментов, которые могут быть добавлены для развития сигнала, включают PNPP (р-нитрофенилфосфат, динатриевая соль), ABTS (2,2'-азинобис [3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота]-диаммониевая соль), OPD (о-фенилендиамин дигидрохлорид) и TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (SOMA Labs, Romeo, Mich.), в том числе Sureblue TMB Microwell Peroxidase Substrate 1-component (KPL, #52-00-03). Реакцию можно остановить, добавив останавливающий реагент (*например*, останавливающий раствор TMB). Можно определить поглощение на подходящей длине волны (*т.е.,* 450 нм).

Для измерения флуоресценции доступны различные флюорометры. Для детекции хемилюминесценции, например, для детекции хемилюминесценции субстратов пероксидазы хрена (HRP), доступны люминометры или пленки. В случае ферментов флуоресцентный, хемилюминесцентный или окрашенный продукт может быть определен или измерен флуорометрически, люминометрически, спектрофотометрически или визуально. Например, реагент

против метки может быть конъюгирован с пероксидазой хрена (HRP) или другим обнаруживаемым агентом.

Обнаружению может способствовать наличие флуоресцентного, радиоактивного или другого обнаруживаемого фрагмента. Например, любые полипептиды ADA2, предусмотренные в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа и варианты полипептидов и их модифицированные формы, могут содержать N- или C-концевую метку, такую как метка FLAG, и могут быть обнаружены с использованием реагента против метки, такого как анти-FLAG антитело. Выбор реагента против метки зависит от метки, которая используется со связывающей молекулой или белком. Кроме того, выбирают реагент против метки, который совместим с условиями среды (*например,* pH), используемыми в анализе. Специалист в данной области техники способен идентифицировать или выбрать такие реагенты и протестировать их совместимость с условиями анализа. Реагенты против метки легко доступны, например, из коммерческих источников или из других источников. Примеры реагентов против метки, которые могут быть использованы для обнаружения в способах в настоящем документе, включают анти-FLAG антитело или анти-Myc антитело (доступны от таких поставщиков, как Abcam, Cambridge, MA; GeneTex, Irvine, CA), но не ограничиваясь этим. Кроме того, в зависимости от целевого белка и силы сигнала другие антитела и/или хромогенные субстраты могут быть использованы в вариантах ELISA. Например, для нативных белков, которые не содержат метки, обнаружение может быть осуществлено с использованием двух антител, *например*, первичного антитела, распознающего нативную мишень, и вторичного антитела, конъюгированного с ферментами, используемыми для обнаружения.

Как правило, в способах в настоящем документе способом обнаружения связанного комплекса является способ, который подразумевает количественное определение. Например, метка может давать сигнал, такой как колориметрический сигнал, хемилюминесцентный сигнал, хемифлуоресцентный сигнал или радиоактивный сигнал. В зависимости от природы метки различные методы могут быть использованы для обнаружения или для обнаружения и количественного определения метки. Например,

способы количественного определения включают спектрофотометрические, флуоресцентные и радиометрические способы, но не ограничиваясь этим.

c. Дот-блоттинг и другие анализы связывания радиоактивно меченного гепарина

Степень связывания гепарина также можно определить с использованием блот-способов с радиоактивно меченным гепарином. Например, дот-блоттинг может быть использован для обнаружения и количественного определения пикомолярных количеств целевого связывающего гепарин белка. Белки наносят на нитроцеллюлозу и далее инкубируют с ^{125}I-гепарином. Связывание гепарина с белками обнаруживают с помощью радиоавтографии и количественно оценивают с помощью сканирующей денситометрии; белки количественно определяют с помощью денситометрического анализа нитроцеллюлозы, окрашенной амидо-черным (Hirose *et al.* (1986) Analytical Biochemistry 156(2):320-325). В другом примере меченный радиоактивным изотопом гепарин, такой как ^{3}H-гепарин, инкубируют в 96-луночном микротитровальном формате с целевым связывающим гепарин белком, таким как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты или модифицированные формы. Далее смесь переносят в 96-луночные микротитровальные фильтровальные планшеты, с помощью которых отфильтровывают несвязанный гепарин и целевой белок. Связывание детектируют сцинтилляционным подсчетом (смотрите, Proudfoot *et al.* (2003). PNAS 100(4):1885-1890).

3. Способы оценки стабильности

Стабильность любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, при определенных условиях может быть определена любым способом, известным специалисту в данной области техники и используемым для оценки стабильности белка. Стабильность при определенных условиях (*например,* условия высокой температуры для определения термостабильности, условия высокого или низкого pH для определения устойчивости к pH, условия плазмы крови для определения стабильности в плазме и хранение в течение длительного периода времени для определения долгосрочной стабильности) можно оценить, определяя изменения физических свойств полипептида, в том

числе структурную конфигурацию или конформацию, ферментативную активности, разворачивание белка, агрегацию и стабильность, но не ограничиваясь этим, до и после воздействия определенного условия. Стабильность также можно оценить путем сравнения одной или нескольких видов активностей, агрегации или других физических свойств в денатурирующих условиях с нативным полипептидом ADA2, полипептидом ADA2 дикого типа или полипептидом ADA2 сравнения.

Стабильность белка является мерой поддержания одного или нескольких физических свойств белка в ответ на воздействие условий окружающей среды (*например,* повышенной температуры). В одном из примеров физическим свойством является поддержание ковалентной структуры белка (*например,* отсутствие протеолитического расщепления, нежелательного окисления или дезамидирования). В другом примере физическим свойством является присутствие белка в правильно фолдированном состоянии (*например,* отсутствие растворимых или нерастворимых агрегатов или преципитатов). В одном из примеров стабильность белка измеряется путем оценки биофизического свойства белка, например, термостабильности, профиля разворачивания белка в зависимости от pH, стабильное снятие гликозилирования, растворимости, биохимической функции (*например,* ферментативной активности, способности связываться с белком (*например,* лигандом, рецептором, антигеном, etc.) или химическим фрагментом, etc.), и/или их комбинаций. В другом примере биохимическая функция может быть продемонстрирована аффинностью связывания взаимодействия. Кроме того, стабильность может быть оценена путем визуального осмотра, оценки процента выхода, чистоты белка и кажущейся температуры плавления. Из измерений стабильности также можно извлечь важную биологическую информацию; снижение стабильности может свидетельствовать о разворачивании белка, неправильном сворачивании и агрегации, что может привести к тому, что полипептиды будут неэффективны для лечения. Такие анализы могут быть осуществлены при любых условиях, которые могут приводить к нестабильности белка, и могут быть применены для оценки любых физических или функциональных свойствах, связанных с белком ADA2. Стабильность может

быть измерена с использованием любых способов, известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе.

a. Условия

i. Стабильность в плазме

Для терапевтических применений, таких как лечение опухолей или рака, желательно вводить субъекту дозу ADA2, которая будет поддерживать активность аденозиндезаминазы (ADA) в плазме в течение периода времени, достаточного для достижения терапевтического эффекта. Следовательно, для эффективного лечения необходимо сохранение достаточной стабильности в плазме и в опухолевом микроокружении (TME). Стабильность в плазме любой ADA2, описанной в настоящем документе, такой как ADA2 дикого типа, ее вариант или конъюгат, может быть определена путем измерения изменений ферментативной активности и/или других физических свойств до и после инкубации в плазме, *например*, *ex vivo* в плазме млекопитающих.

Стабильность можно оценить *in vitro* или *in vivo*. Например, стабильность можно протестировать после воздействия плазмы в течение желаемого периода времени, который может быть установлен эмпирически или выбран специалистом в данной области в зависимости от требуемого периода времени. Например, время инкубации может составлять, по меньшей мере, 1 час, например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72 часа и более. Белок можно вводить напрямую системно, например внутривенно, и оценивать активность. В других примерах белок может подвергаться соответствующим условиям инкубации *in vitro*. В одном из примеров стабильность ADA активности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть измерена после инкубации при 37 °C, *ex vivo* в 25% плазме или сыворотке, например, в человеческой или не человеческой плазме или сыворотке, например, в плазме мыши. Например, как показано в настоящем документе, ADA2 обладает большей стабильностью, чем ADA1 после длительной инкубации (*например,* в течение 24 часов) в плазме. Другие условия, такие как температура, тип плазмы и буферные условия, также могут быть выбраны, основываясь на требуемых условиях, которые должны быть протестированы.

ii. Термостабильность

Белки отличаются степенью своей термической стабильности (или термостабильности). В частности, белки с биологической активностью, такие как ферменты, могут иметь разные оптимальные температуры. Термостабильность, свойство белка противостоять необратимым изменениям его химической или физической структуры при относительно высокой температуре, может быть показателем общей стабильности белка. Повышенная температура обычно индуцирует разворачивание белка и нарушение вторичной, третичной и четвертичной структуры белков, что приводит к дестабилизации белка. Термостабильность белка, такого как любой полипептид ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может быть определена путем измерения изменений ферментативной активности и/или других физических свойств до и после инкубации при относительно высоких или низких температурах.

Стабильность белка может быть определена путем измерения активности белка с течением времени. Температуру плавления (T_m) белка можно использовать в качестве маркера стабильности раствора и *in vivo* стабильности для белков. Температура разворачивания конкретного белка представляет собой температуру, при которой белок утрачивает свою вторичную структуру и, как правило, утрачивает свою активность, и может быть определена с использованием способов, известных специалистам в данной области, и описанных в настоящем документе, таких как дифференциальная сканирующая калориметрия (DSM). В другом примере могут быть использованы другие способы определения физических свойств белка, такие как динамическое светорассеяние (DLS), для характеристики стабильности белков в зависимости от температуры. В других примерах термостабильность может быть измерена биохимическими способами. Примером биохимического способа оценки термостабильности является анализ термического воздействия. В "анализе термического воздействия" полипептид подвергается воздействию ряда повышенных температур в течение заданного периода времени. Например, в одном из вариантов воплощения тестируемые полипептиды подвергают воздействию диапазона повышающихся температур, *например*, в течение 10

минут. Затем активность белка анализируют с помощью соответствующего биохимического анализа (*например*, анализа аденозиндезаминазы). Анализ термического воздействия может быть использован для определения температуры, при которой сохраняется 50% активности аденозиндезаминазы (ADA) (*m.e.*, значение T_C или T_{50}). Значения T_C или T_{50} необязательно эквивалентны значениям T_m, полученным с помощью биофизических способов анализа. Такой анализ может быть осуществлен для оценки термостабильности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов, конъюгатов и других модифицированных форм.

iii. Стабильность в зависимости от pH или в оптимуме pH

Белки также различаются по своей способности переносить изменения pH или могут иметь различные оптимумы pH для биологической активности. Изменения pH в окружающей среде могут приводить к изменению заряда основной и кислотной групп боковых цепей аминокислот в белке, вызывающего изменения в электростатических взаимодействиях, которые могут дестабилизировать нативную структуру. Относительно небольшие изменения pH могут приводить к довольно значительному снижению конформационной стабильности белка, а изменения в конформационной стабильности также могут приводить к агрегации белков. Ионная сила в растворе и изоэлектрическая точка (pI) раствора также влияют на стабильность белка в растворе при различных значениях pH.

Например, pH опухолевого окружения и оптимум pH конкретного белка могут влиять на терапевтическую эффективность белка ADA2. Например, в опухолевом микроокружении (TME) имеются участки, которые обычно находятся в гипоксической области с относительно кислым pH, таким как pH 6,5-6,9 или ниже. С другой стороны в участках с пролифелирующей тканью, например, вблизи кровеносных сосудов, TME имеет более нейтральный pH. Таким образом, оптимум pH белка ADA2 может быть важным фактором в определении дозировки и лекарственной формы белков, используемых в способах лечения опухолей, как описано в настоящем документе.

Стабильность белка, такого как любой полипептид ADA2, предусмотренный в настоящем документе, в среде с определенным pH, можно определить, измеряя изменения ферментативной активности и/или другие физические свойства, до и после инкубации в среде с относительно высоким или низким pH. Например, ферментативную активность любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, можно измерить, используя анализ активности ADA, описанный в настоящем документе, при различных pH (например, при pH в диапазоне от или примерно от 6,0 до 8,0, например, от или примерно от 6,5 до 7,5, включительно, например 6,5 ± 0,2 или 7,4 ± 0,2). В другом примере другие способы определения физических свойств белка, такие как динамическое светорассеяние (DLS), могут быть использованы для характеристики стабильности белков как функции pH раствора.

iv. Другие условия

Другие условия в среде или в лекарственной форме, такие как ионная сила, состав буфера, наличие других веществ, таких как другие белки в опухолевом микроокружении, наличие фармацевтических эксципиентов или наличие других агентов, используемых для комбинированной терапии, могут оказывать влияние на стабильность полипептида, используемого в способе лечения, такого как любой полипептид ADA2, предусмотренный в настоящем документе. Стабильность полипептида в условиях, которые могут влиять на стабильность и функцию белка, может быть протестирована с использованием способов, описанных в настоящем документе ниже, но после инкубации в определенных тестируемых условиях. Анализы могут быть использованы для внесения незначительных корректировок в лекарственные формы, предусмотренные в настоящем документе, при сохранении стабильности ADA2 и/или других агентов, используемых в комбинированной терапии.

b. Определение физических свойств

Стабильность полипептида, такого как любой полипептид ADA2, предусмотренный в настоящем документе, может быть определена путем измерения изменений физических или функциональных свойств или активности полипептида, таких как ферментативная активность, структурная конфигурация или конформация, ферментативная активность, разворачивание белка, агрегация

и растворимость, с использованием любых способов, известных в данной области техники. Оцениваемое функциональное или физическое свойство можно сравнивать при наличии и в отсутствии условия (*например*, плазма, температура, pH или другое условие). Понятно, что анализ для сравнения или оценки стабильности белка при воздействии условия и отсутствии его воздействия является практически одинаковым, за исключением наличия или степени воздействия условия.

Белки стабилизируются за счет физических сил, таких как водородные связи, гидрофобные взаимодействия, электростатические взаимодействия, дисульфидные связи и силы Ван-дер-Ваальса. Нарушение любой из этих сил может дестабилизировать белок и нарушение этих сил можно измерить, используя различные способы, известных в данной области техники. Также, при некоторых условиях, таких как определенный pH или температура, или высокая концентрация белка при сверхэкспрессии, полипептид может образовывать белковые агрегаты. Агрегаты белков представляют собой необратимо ассоциированные белковые молекулы, образующие олигомеры более высокого порядка с нативными или не нативными структурами белков, которые могут быть растворимыми или нерастворимыми в природе. Агрегация часто приводит к конформационной дестабилизации белка.

Способы определения изменений физических свойств включают спектроскопию, термодинамические способы, гидродинамические способы, хроматографию, электрофорез, анализ биологической активности и анализ белок-белковых взаимодействий (смотрите, *например,* Uversky, V. and E. Permiakov, eds., Methods in Protein Structure and Stability Analysis, Nova Science Publishers, New York (2007); Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64). Увеличение размера частиц и/или уменьшение температуры плавления также может свидетельствовать о денатурации и последующей агрегации полипептида ADA2. Кроме того, стабильность белка можно оценить путем визуального контроля целостности белка в электрофоретических способах, путем расчета процента выхода белка, чистоты белка и кажущейся температуры плавления. Примеры анализов для оценки стабильности белка описаны ниже.

i. Ферментативная активность

Нарушение стабильности может вызвать изменения в третичной структуре активного сайта фермента, что приводит к нарушению ферментативной активности. Биологическая активность часто тесно коррелирует с изменениями других физических свойств белка, таких как спектры кругового дихроизма. Функциональные анализы, такие как анализы ферментативной активности, в том числе любые анализы активности аденозиндезаминазы (ADA), описанные выше, могут быть использованы в качестве меры стабильности белка при наличии и в отсутствии оцениваемого условия. Например, стабильность аденозиндезаминазы (ADA) может быть измерена до и после воздействия определенных условий, *например*, условий, описанных выше в разделе F.2.a, для оценки стабильности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Воздействие определенного условия, такого как инкубация в плазме, может быть осуществлено в фиксированный момент времени или оцениваться с течением времени в нескольких временных точках.

ii. Хроматографический анализ чистоты белка

Способы оценки чистоты нативного белка могут быть использованы в качестве показателя для определения степени деградации белка или других дестабилизированных состояний белка. Чистота белка может быть измерена с использованием хроматографических способов, например, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC). Чистота белка при ее определении с помощью RP-HPLC представляет собой процент, приходящийся на долю основного пика белка ADA2, от пиков всех других белковых компонентов. Таким образом, с помощью RP-HPLC и других аналогичных способов, известных специалисту в данной области техники, можно оценить деградацию фермента. Чистоту белка также можно оценивать с течением времени. Чистоту белка можно оценить при воздействии одного или нескольких условий, таких как условия, описанные выше в разделе F.2.a, и в присутствии разных его количеств. Процент выхода также можно определить в виде относительного процента содержания полипептида при различных условиях и разной продолжительности воздействия условий по сравнению с образцом сравнения. Стабильность любых полипептидов ADA2,

предусмотренных в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов, конъюгатов или других модифицированных форм, также можно определить путем измерения окисления полипептида с помощью RP-HPLC. Процент окисления является показателем суммы площадей под основным (ox-1) и минорным (ox-2) пиками.

В другом примере другие хроматографические способы, такие как эксклюзионная хроматография (SEC) могут быть использованы для определения фолдинга белка или состояния мультимеризации. SEC может быть осуществлена в нативных условиях в растворе, сохраняющих макромолекулярные взаимодействия. С помощью эксклюзионной хроматографии измеряется гидродинамический объем (не молекулярная масса), что позволяет различить фолдированные и развернутые варианты одного и того же белка. Количественная оценка уровня агрегации белков в лекарственных формах, осуществляемая с помощью SEC, как правило, сопровождается детекцией в УФ области спектра, иногда на разных длинах волн, и часто в сочетании характеристикой молекулярной массы с помощью детекции многоуглового светорассеяния. SEC также может использоваться для изучения обратимой самосборки белка (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

iii. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Термостабильность полипептида в растворе, такого как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть определена с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). В DSC, кювету для образца (содержащую белок и буфер) и кювету сравнения (только с буфером) нагревают вместе, повышая температуру с постоянной скоростью, и регистрируют избыток тепла, необходимый для поддержания в кювете с образцом такой же температуры, как в кювете сравнения (из-за перехода белка из фолдированного, нативного состояния в развернутую форму по мере увеличения температуры. Средняя температура теплового перехода (или температура теплового плавления, T_m) обычно используется в качестве показателя термостабильности. С помощью DSC также можно получить подробную информацию о термодинамических параметрах разворачивания

белка, включая изменение энтальпии (ΔH), энтропии (ΔS), свободной энергии Гиббса (ΔG) и теплоемкости (ΔCp), если условия эксперимента допускают обратимые тепловые переходы. DSC также можно использовать для определения влияния условий раствора (pH, иона сила) и эксципиентов на стабильность белка при включении белка в состав лекарственной формы (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

iv. Дифференциальная сканирующая флуориметрия

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF), также называемая флуоресцентным анализом теплового сдвига, представляет собой способ, используемый для мониторинга тепловых переходов белков, таких как разворачивание, в присутствии флуоресцентного красителя. Полярно-чувствительные флуоресцентные красители, используемые для DSF, сильно флуоресцируют в неполярной среде (*например*, в гидрофобных карманах (частично) развернутых белков), но при этом их флуоресценция гасится в водном растворе и/или в состоянии нативного белка. DSF может быть использована для определения конформационной стабильности белков. Если построить кривую зависимости интенсивности флуоресценции красителя в присутствии белка от температуры, средняя температура перехода (T_h) белка будет представлять собой точку перегиба полученного сигмовидного графика. Значения T_h для разных белков в различных растворах, полученные в экспериментах DSF, хорошо коррелируют со значениями температуры теплового плавления (T_m), определенными с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Кроме того, с помощью DSF может быть получена информация о кооперативных (двухстадийных) или сложных переходах в процессе разворачивания многодоменных белков (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

Краситель может представлять собой низкомолекулярную молекулу, пептид или нуклеиновую кислоту, и может быть получен с использованием обычного инструмента ПЦР в реальном времени. Обычно используемые флуоресцентные красители включают SYRPO Orange, ANS, ROX™ и Nile red. Например, температуру плавления любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов, конъюгатов или других

модифицированных форм, можно оценить, используя краситель теплового сдвига белков ROX™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; номер по каталогу 4461146) в качестве флуоресцентного красителя, и систему RT-PCR ViiA7 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) для измерения сдвига флуоресценции с увеличением температуры образцов.

v. Спектроскопия собственной флуоресценции

Стабильность полипептида, такого как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты, конъюгаты и другие модифицированные формы, может быть определена путем измерения изменений его собственной флуоресценции. В спектроскопии собственной флуоресценции детектируется флуоресценция от внутренних флуорофоров белков, таких как остатки ароматических аминокислот триптофана и тирозина. Свойства флуоресценции триптофана, в том числе ее интенсивность и длина волны максимальной эмиссии, особенно чувствительны к локальному окружению триптофана. Благодаря этому эмиссию часто можно использовать в качестве зонда для изучения изменений структур белков более высоких порядков. Разворачивание белка часто сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции и сдвигом максимума эмиссии остатков Trp в область более высоких длин волн (красное смещение). Флуорометры, оснащенные планшетным ридером и функцией контроля температуры, могут быть использованы для оценки конформационной стабильности белковых терапевтических агентов. (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

vi. Круговой дихроизм

Спектроскопия кругового дихроизма (CD) измеряет дифференциальное поглощение левостороннего и правостороннего циркулярно-поляризованного света и является популярным инструментом для характеристики содержания вторичной структуры белка (*m.e.,* α-спирали и β-листа) в зависимости от температуры и условий раствора. Для этой цели используются спектры CD в дальней УФ области (160-250 нм), тогда как спектры CD в ближней УФ области (230-320 нм) могут содержать информацию о локальном окружении боковых цепей ароматических кислот и дисульфидов, которые могут быть использованы для мониторинга изменений третичной структуры. CD совместим с некоторыми

буферами и добавками, обладающими высоким поглощением в УФ области спектра (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

vii. Динамическое светорассеяние

Динамическое светорассеяние (DLS), также известное как фотонно-корреляционная спектроскопия или квазиупругое рассеяние света, используется для мониторинга изменений гидродинамических свойств белка в растворе (*например,* агрегации), а также для измерения абсолютных размеров. С помощью DLS измеряется флуктуация интенсивности рассеянного света в растворе в зависимости от времени, и посредством автокорреляционного анализа можно получить информацию о коэффициентах диффузии, гидродинамических радиусах и распределении частиц по размерам от нескольких нанометров до примерно 1 мкм. Сигнал DLS очень чувствительно к наличию самых крупных частиц в растворе. DLS используется для обнаружения белковых олигомеров и агрегатов более высоких порядков. DLS использовалось для характеристики коллоидной стабильности белковых терапевтических агентов, таких как моноклональные антитела, в зависимости от pH и температуры раствора. DLS также использовалось для оценки склонности белков к агрегации в ответ на физические воздействия в процессе производства, доставки и введения многих белков (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64). Формирование агрегатов ADA2 после воздействия определенных условий можно определить, измеряя гидродинамический радиус частиц с помощью динамического светорассеяния при различных условиях (*например,* денатурирующие условия или другие условия хранения).

viii. Статическое светорассеяние

Статическое светорассеяние (SLS) представляет собой метод, в котором измеряется усредненная по времени интенсивность рассеянного света, что обеспечивает информацией о размере частиц, взвешенных в растворе. Многоугловое светорассеяние (MALS) метод, в котором регистрируется и анализируется интенсивность статического светорассеяния под несколькими углами, может быть использован для определения абсолютной молекулярной массы и радиуса вращения белков и олигомеров с более высокой молекулярной массой. MALS детекция может быть комбинирована с эксклюзионной

хроматографией (SEC) или поточным фракционированием в поле (FFF) для разделения и последующей характеристики белковых агрегатов. Светорассеяние также можно измерить с помощью флуоресцентной детекции путем простого сканирования всей спектральной области, содержащей как сигналы флуоресценции, так и светорассеяния. Это позволяет получить данные как о конформационной стабильности, так и об агрегации (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64).

ix. Измерение мутности

Величина мутности (или оптической плотности) раствора пропорциональна как размеру, так и количеству белковых агрегатов в растворе (Оптическая плотность = поглощение + рассеяние света). Мутность обычно измеряется в диапазоне длин волн 320-400 нм, поскольку белки, как правило, не обладают значительным поглощением в этом диапазоне длин волн, а величина сигнала рассеяния света тем больше, чем меньше длина волны. Во время тестирования стабильности склонность белков к агрегации в различных лекарственных формах может быть оценена либо в методе с диапазоном температур (измерение изменений мутности в зависимости от повышения температуры), либо кинетическим способом (измерение изменений мутности в зависимости с течением времени при постоянной температуре (Chaudhury *et al.* (2014) The AAPS Journal 16(1):48-64)).

x. Другие способы определения стабильности

Другие способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть использованы для определения стабильности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов и модифицированных форм в способе лечения, предусмотренном в настоящем документе, включают электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и визуальный анализ целостности белка, иммуноблоттинг, спектроскопию ядерного магнитного резонанса (NMR), изотермическую титрационную калориметрию, электрофорез в поперечном градиенте мочевины (TUG-PAGE), рассеяние нейтронов, аналитическое ультрацентрифугирование, тритиевую планиграфию и вискозиметрический анализ. Визуальный анализ целостности белка может включать, например, наблюдение продуктов

деградации с более низкой молекулярной массой или продуктов агрегации с более высокой молекулярной массой в PAGE гелях.

4. Анализы для оценки терапевтической активности

Терапевтическая активность, такая как противоопухолевая активность любой ADA2, используемой в способе лечения, предусмотренном в настоящем документе, может быть измерена с использованием *in vitro* и *in vivo* функциональных анализов. В настоящем документе предусмотрены примеры анализов и систем, используемых для мониторинга терапевтического эффекта от лечения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

a. *In vitro* тесты

Противораковую активность любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа и ее вариантов, конъюгатов и других модифицированных форм, и комбинированной терапии с использованием любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и других агентов, можно оценить *in vitro*, например, инкубируя культуру раковых клеток с производным, и далее оценивая ингибирование роста клеток в культуре. Подходящие клетки для такого тестирования включают мышиные раковые клетки лейкемии P388, раковые клетки меланомы B16 и клетки рака легкого Льюис, а также человеческие клетки рака молочной железы MCF7, раковые клетки OVCAR-3, клетки рака легкого A549, человеческие клетки рака молочной железы MX-1, линия клеток рака толстой кишки HT29, клетки рака печени HepG2, клетки рака толстой кишки HCT116, человеческие клетки рака толстой кишки Caco-2, линия клеток глиомы человека U138MG, человеческие клетки рака предстательной железы DU 145, клетки лимфатической лейкемии L1210, клетки лимфатической лейкемии L4946, клетки лимфосаркомы 6C3HED, клетки аденокарциномы молочной железы TA3, клетки карциномы Эрлиха E2, клетки аденокарциномы 755, клетки саркомы 180 и клетки меланомы B16, но не ограничиваясь этим.

Обратимую аденозин-опосредованную иммуносупрессию любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа и ее вариантами, конъюгатами и другими модифицированными формами, и комбинированной терапией с использованием любой ADA2, предусмотренной в

настоящем документе и других ганетов, можно оценить *in vitro*, например, с помощью анализов пролиферации. Такие анализы включают анализы пролиферации Т-клеток или анализы пролиферации смеси NK и T (NK/T) клеток, в присутствии аденозина и/или любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и/или любых других агентов комбинированной терапии, но не ограничиваясь этим. Например, иммуносупрессивный эффект аденозина на различные иммунные клетки, такие как лимфоциты, естественные киллеры (NK), полиморфно-ядерные гранулоциты и фагоциты, такие как тканевые макрофаги, можно оценить с помощью анализов пролиферации, используя иммунные клетки или их смесь, такую как смесь NK и T (NK/T) клеток, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Эффект от любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и любых других агентов комбинированной терапии, предусмотренных в настоящем документе, можно оценить, сравнивая результаты таких анализов пролиферации в присутствии аденозина, с добавлением или без добавления любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и/или любых других агентов комбинированной терапии, предусмотренных в настоящем документе, в том числе ингибиторов иммунных контрольных точек. Агенты комбинированной терапии описаны в разделе H.4 ниже.

Анализы пролиферации могут быть использованы для измерения активности любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа и ее вариантов, конъюгатов и других модифицированных форм, и комбинированной терапии с использованием любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и других агентов, в присутствии аденозина. С помощью анализов может быть измерена пролиферация иммунных клеток, активность которые подавляется добавлением аденозина. Клетки можно инкубировать в течение времени, достаточного для пролиферации клеток (например, 12 часов или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней, 2, 3, 4, 5 недель или дольше). Пролиферацию клеток можно измерить любым способом, известным в данной области, включая анализ включения ^{3}H-тимидина, анализ с 5-бром-2-дезоксиуридином (BrdU), ELISA, микропланшетный анализ с тетразолием и анализ с кислой фосфатазой (*например,* Maghni *et al.* (1999) *J. Immunol. Method.*

223(2):185-194). Пролиферацию клеток также можно измерить, используя наборы, доступные из Invitrogen (набор для анализа пролиферации клеток Cyquant NF), Cambrex (ViaLight HS (высокая чувствительность) BioAssay), Promega (люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo), Guava Technologies (анализ роста клеток CellGrowth), Stratagene (анализ пролиферации клеток Quantos) (*например,* Assays for Cell Proliferation Studies, *Genetic Eng. Biotechnol. News.* 26(6)). В некоторых примерах пролиферация клеток может быть нормирована на пролиферацию клеток в присутствии аденозина. В некоторых примерах ролиферация клеток может быть нормирована на пролиферацию клеток в отсутствии аденозина. В примерах анализов пролиферации клетки могут быть добавлены в лунку 96-луночного планшета в нормальной среде для роста, которая включает аденозин и любую ADA2, предусмотренную в настоящем документе, или любые другие агенты комбинированной терапии, которые оценивают.

b. *In vivo* модели на животных

Модели на животных могут быть использованы для оценки эффектов терапевтической активности, такой как ингибирование роста опухоли, предусмотренной в настоящем документе, с использованием любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Например, модели на животных могут быть использованы для оценки размера, объема или роста опухоли. Кроме того, модели на животных могут быть использованы для оценки фармакокинетики или переносимости композиции или комбинаций.

Модели на животных могут включать модели на мышах, крысах, кроликах, собаках, морских свинках и приматах, не относящихся к человеку, таких как яванские макаки или макаки-резус, но не ограничиваясь этим. Модели на животных включают генетические модели, а также ксенотрансплантатные модели. Например, ксенотрансплантатные модели включают модели, в которых до тестирования агентов, опухоль может быть создана в подходящих для тестирования животных, таких как иммунодефицитные мыши, например, безтимусные мыши или SCID мыши, или иммунокомпетентные животные. В некоторых примерах иммунодефицитным мышам, таким как безтимусные мыши или SCID мыши, прививают опухолевую клеточную линию, например, из

аденозин-ассоциированного рака, чтобы получить модель этого рака на животных. В других случаях используются сингенные модели с использованием иммунокомпетентных животных.

Примеры клеточных линий, в том числе рака, ассоциированного с сигналингом через аденозин, включают мышиные клетки рака толстой кишки CT26, человеческие клетки рака молочной железы MCF7, клетки рака печени HepG2, человеческие клетки рака толстой кишки Caco-2, клеточную линию глиомы человека U138MG, человеческие клетки рака предстательной железы DU 145, клетки лимфатической лейкемии L1210, клетки лимфатической лейкемии L4946, клетки лимфосаркомы 6C3HED, клетки аденокарциномы молочной железы TA3, клетки карциномы Эрлиха E2, клетки аденокарциномы 755, клетки саркомы 180 и клетки меланомы B16, но не ограничиваясь этим. Другие раковые клетки, которые могут быть использованы в ксенотрансплантатных моделях на животных включают клетки карциномы предстательной железы PC3, клетки аденокарциномы поджелудочной железы BxPC-3, клетки карциономы молочной железы MDA-MB-231, клетки опухоли молочной железы BT474, клетки опухоли предстательной железы Tramp C2, клетки рака предстательной железы Mat-LyLu, мышиные клетки карциномы поджелудочной железы MH194 и мышиные клетки рака легких KLN205.

Примером модели опухоли на животных, которая может быть использована для оценки эффекта от лечения рака с помощью ADA2, предусмотренной в настоящем документе, является сингенная модель опухоли CT26. Эта модель создается путем подкожной инъекции перичных мышиных клеток карциномы толстой кишки CT26 (ATCC CRL-2638) в сингенных мышей BALB/c. Мышей оставляют до образования опухоли, после чего им вводится агент, используемый для лечения, такой как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, или комбинированная терапия, включающая лечение ADA2. Другой пример модели рака поджелудочной железы на животных включает формирование опухолей у животных с помощью клеток аденокарциномы поджелудочной железы BxPC-3 (смотрите, *например,* Von Hoff *et al.* (2011) *J. Clin. Oncol.*, 29:4548-54). Другие примеры моделей опухолей на

животных включают мышиную сингенную модель опухоли MH194+PSC4 и мышиную сингенную модель рака легких KLN205.

Другие модели на животных, такие как модели на мышах, разработанные для исследования иммунотерапии рака или комбинированной терапии, могут быть использованы для оценки терапевтического эффекта от лечения с помощью ADA2. Например, могут быть использованы модели на мышах, разработанные для исследования как эффективности иммунотерапии рака, так и иммуноопосредованны нежелательных явлений (irAE). Некоторые виды иммунотерапии рака, мишенью которых являются иммуномодулирующие рецеторы, такие как комбинированная терапия агентами против CTLA4 и агентами против PD-1, также может вызывать irAE, такие как сыпь, диарея, колит и повреждение печени. Следовательно, модели на мышах, которые имитируют кинетику ответа, наблюдающегося в клинике, и модели, с помощью которых могут быть воспроизведены возможные irAE, могут быть использованы для оценки как эффективности, так и возможных нежелательных явлений, связанных с лечением. Такие модели включают модели, индуцированные канцерогеном, например, индуцированная метилхолантреном (MCA) фибросаркома и индуцированные 7,12-диметилбенз[α]антраценом (DMBA)/12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетатом (TPA) папилломы на коже, или генно-инженерные модели опухолей на мышах, в которых осуществляется экспрессия онкогенов и/или не функционируют супрессоры опухолей, часто в специфических тканях и/или временно. Примеры включают трансгенных мышей Her2/neu или PyMT, которые воспроизводят рака молочной железы, модель MT/ret спонтанной метастатической меланомы и мышей BrafCATyr-creERT2Ptenfl/fl, в которых 4-гидрокситамоксифен (4-HT) индуцирует de novo меланому, а также использование аденовирусных векторов, кодирующих рекомбиназу Cre для селективного введения мутаций в окоген Kras и ген опухолевого супрессора Tp53 в дыхательном эпителии с целью индукции аутохтонных опухолей легких. Индуцированные канцерогеном модели рака на мышах лучше воспроизводят рак, являющийся иммуногенным. Альтернативно, в моделях эксплантатов опухоли опухоли могут быть трансплантированы ортотопически, *т.е.,* в обычное место своего возникновения, а не подкожно,

чтобы точнее воспроизвести опухолевое микроокружение. Другим примером мышиной модели для оценки эффективности и irAE комбинированной иммунотерапии рака являются мыши Foxp3-DTR, которые могут быть в определенных условиях лишены своих Treg, чтобы имитировать максимальную супрессию всех иммунных клеток. Эта модель позволяет оценить эффективность модулирования коингибирующих/костимулирующих рецепторов или других видов терапии, направленнного на ослабление противоопухолевого иммунитета/irAE (Liu *et al.* (2014) Clinical & Translational Immunology 3:e22)

Могут быть использованы генетические модели, в которых получают животных с дефицитом по одному или нескольким генам, что приводит к развитию или образованию опухоли. С помощью таких генно-инженерных мышиных моделей (GEMM) можно воспроизвести молекулярные и клинические особенности заболевания. Например, генетическая модель рака поджелудочной железы включает специфическую экспрессию в поджелудочной железе эндогенных мутантных аллелей *Kras* и *Trp53*, что приводит к появлению мутантных мышей с дефицитным фенотипом (называются KPC мыши; LSL-$Kras^{G12D}$, LSL-$Trp53^{R172H}$, Pdx-1-Cre). У мышей KPC развиваются первичные опухоли поджелудочной железы, особенности которых аналогичны заболеванию человека, включая устойчивость к аналогу нуклеозида гемцитабину (смотрите, *например,* Frese *et al.* (2012) *Cancer Discovery*, 2:260-269).

i. Метаболическая активность опухоли

Снижение метаболической активности опухоли можно тестировать для лечения ADA2, предусмотренного в настоящем документе. Метаболическую активность опухоли можно оценить, используя стандартные методики, известные в данной области. Например, может быть использована позитронно-эмиссионная томография с [^{18}F]-фтордезоксиглюкозой (FDG-PET). PET является не инвазивным способом диагностики, с помощью которого можно получить изображения и оценить количественные параметры перфузии, жизнеспособности клеток, пролиферации и/или метаболической активности тканей. Изображения получают в результате использования разных биологических веществ (*например,* сахаров, аминокислот, веществ-предшественников в процессе метаболизма, гормонов), меченных позитронно-

активными радиоактивными изотопами. Например, FDG является аналогом глюкозы и поглощается живыми клетками на первых стадиях нормального пути метаболизма глюкозы. При раке наблюдается увеличение гликолитической активности, что приводит к задержке FDG в раковой клетке. Уменьшение накопления FDG коррелирует с уменьшением метаболической активности опухоли и противораковой активностью. Специалистам в области техники известно руководство по PET визуализации, которому должен следовать любой лечащий врач или техник.

ii. Размер и объем опухоли

Например, можно осуществлять мониторинг размера и расположения опухоли и/или метастазов. Мониторинг размера опухоли и/или метастазов можно осуществлять любым из множества способов, известных в данной области техники, включая способы внешней оценки или томографические или магнитные способы визуализации, такие как описанные в настоящем документе способы обнаружения. Мониторинг размера с течением времени (в нескольких временных точках) может обеспечить информацией об эффективности терапевтических способов, предусмотренных в настоящем документе. Кроме того, мониторинг увеличения или уменьшения размера опухоли или метастазов также может предоставить информацию о наличии (*т.е.*, обнаружение и/или диагностика) дополнительных опухолей и/или метастазов у субъекта. Мониторинг размера опухоли с течением времени может обеспечить информацией о развитии неопластического заболевания у субъекта, включая эффективность лечения неопластического заболевания у субъекта, такого как лечение, предусмотренное в настоящем документе.

В конкретных примерах снижение размера и/или объема опухоли указывает на то, что терапия работает. Мониторинг размера и объема опухоли можно осуществлять, основываясь на методиках, известных специалисту в данной области техники. Например, мониторинг размера и объема опухоли можно осуществлять с помощью рентгеновского исследования, ультразвуковой визуализации, вскрытия, с использованием калиперов, компьютерной микротомографии или ^{18}F-FDG-PET. Размер опухоли также можно оценить

визуально. В конкретных примерах размер опухоли (диаметр) измеряется непосредственно с помощью калиперов.

В других примерах объем опухоли можно измерить, основываясь на средних измерениях диаметра опухоли (D), полученных с помощью калипера или ультразвуковых оценок. Например, объем опухоли можно определить с помощью аппарата ультразвукового исследования с высокой разрешающей способностью VisualSonics Vevo 770 или другого аналогичного аппарата. Объем опухоли можно определить по формуле $V = D^3 \times \pi / 6$ (если диаметр измерен с помощью калиперов) или $V = D^2 \times d \times \pi / 6$ (если диаметр измерен с помощью ультразвука, где d представляет собой глубину или толщину). Например, с помощью калиперов может быть измерена длина (l) и ширина (w) опухоли, и объем опухоли может быть рассчитан как длина x ширина^2 x 0,52. В другом примере для измерения объема опухоли могут быть использованы сканы, полученные с помощью компьютерной микротомографии (*смотрите, например,* Huang *et al.* (2009) *PNAS*, 106:3426-3430). В качестве примера, мышам можно ввести инъекцию йоверсола Optiray Pharmacy с 74% контрастного вещества (*например,* 741 мг йоверсола/мл), далее мышей анестезировать и сделать сканы с помощью компьютерной томографии, используя сканнер MicroCat 1A или другой аналогичный сканнер (*например,* IMTek) (40 кВ, 600 мкА, 196 стадий вращения, общий угол или вращение = 196). Изображения могут быть реконструированы с помощью программного обеспечения (*например,* программы RVA3; ImTek). Объемы опухолей можно определить, используя доступное программное обеспечение (*например,* программное обеспечение Amira 3.1; Mercury Computer Systems). Объем или размер опухоли также можно определить на основании размера или массы опухоли.

Процент ингибирования роста опухоли может быть рассчитан на основании объема с помощью уравнения: $\%\ TGI = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$, где "$T_n$" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день "n" после получения финальной дозы ADA2; "T_0" представляет собой средний объем опухоли в соответствующей контрольной группе в день 0, до лечения; "C_n" представляет собой средний объем опухоли в соответствующей контрольной группе в день "n"; и "C_0" представляет собой средний объем

опухоли в контрольной группе в день 0, до лечения. Может быть проведен статистический анализ объемов опухолей.

c. Клинический мониторинг

Способы, предусмотренные в настоящем документе, также могут включать одну или несколько стадий мониторинга эффективности лечения, такого как лечение опухоли с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Мониторинг субъектов может заключаться в мониторинге опухоли, общего состояния здоровья субъекта и/или течения заболевания у субъекта. Любая из множества стадий мониторинга может быть включена в способы, предусмотренные в настоящем документе, в том числе мониторинг размера опухоли, мониторинг титра антитела против опухолевого антитела, мониторинг наличия и/или размера метастазов, мониторинг лимфатических узлов субъекта и мониторинг массы тела субъекта или других показателей здоровья, включая маркеры крови или мочи, но не ограничиваясь этим. Целью мониторинга может быть оценка состояния здоровья субъекта или ход терапевтического лечения субъекта, или он может быть предназначен для определения необходимости дальнейшего введения ADA2 или для определения необходимости введения дополнительного агента или лечения, или для определения необходимости введения или продолжения комбинированной терапии.

Также можно осуществлять мониторинг параметров, отражающих состояние здоровья субъекта. Мониторинг состояния здоровья субъекта может быть использован для определения эффективности терапевтического метода, как известно в данной области. Любой из множества способов диагностики состояния здоровья для мониторинга заболевания, такого как неопластическое заболевания или другое заболевание, может быть использован, как известно в данной области. Например, на состояние здоровья субъекта могут указывать масса тела, кровяное давление, пульс, дыхание, цвет, температура или другие наблюдаемые состояния субъекта. Кроме того, наличие или отсутствие или уровень одного или нескольких компонентов в образце, полученном от субъекта, может свидетельствовать о состоянии здоровья субъекта. Типичные образцы могут включать образцы крови и мочи, в которых наличие или отсутствие или

уровень одного или нескольких компонентов можно определить, например, с помощью панели диагностических тестов для крови или мочи. Примеры компонентов, отражающих состояние здоровья субъекта, включают количество лейкоцитов, гематокрит или концентрацию реактивного белка, но, не ограничиваются этим.

5. Фармакодинамика/Фармакокинетика и переносимость

Эффект от введения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов и модифицированных форм, отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом, на фармакокинетические и фармакодинамические свойства любого вводимого агента, также можно оценить *in vivo* с использованием моделей на животных и/или человеческих субъектов, например, в условиях клинического исследования. Фармакокинетические или фармакодинамические исследования могут быть проведены с использованием моделей на животных или могут быть проведены в рамках исследований с пациентами, которым вводят любую ADA2, предусмотренную в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты и модифицированные формы.

Модели на животных включают модели на мышах, крысах, кроликах, собаках, морских свинках и низших приматах, таких как яванские макаки или макаки-резус, но не ограничиваясь этим. В некоторых примерах фармакокинетические и фармакодинамические исследования проводят с использованием здоровых животных. В других примерах исследования проводят с использованием животных моделей заболевания, для лечения которого предусмотрена терапия ADA2, таких как животные модели любого аденозин-ассоциированного заболевания или расстройства, например, модель опухоли.

Фармакокинетические свойства любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариантов и модифицированных форм, можно оценить с помощью измерения таких параметров, как максимальная (пиковая) концентрации (C_{max}), время пика (*m.e.*, когда достигается максимум концентрации; T_{max}), минимальная концентрации (*m.e.*, минимальная концентрация между дозами; C_{min}), период полувыведения

($T_{1/2}$) и площадь под кривой (*m.e.*, область под кривой зависимости концентрации от времени; AUC), после введения. Абсолютную биодоступность ADA2 можно определить путем сравнения площадь под кривой для ADA2 после подкожной доставки (AUCsc) с AUC для ADA2 после внутривенной доставки (AUC_{iv}). Абсолютная биодоступность (F) может быть рассчитана по формуле: $F = ([AUC]_{sc} \times доза_{sc}) / ([AUC]_{iv} \times доза_{v})$. В фармакокинетических исследованиях для оценки эффекта увеличения или уменьшения концентрации фермента, такого как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты и модифицированные формы используемых в комбинированной терапии, в дозе, может быть введен диапазон доз и использовнана разная частота дозирования.

Исследования для оценки безопасности и переносимости лечения также известны в данной области техники и могут быть использованы в настоящем документе. После введения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, или любой комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, можно отслеживать развитие любых нежелательных реакций. Нежелательные реакции могут включать реакции в месте инъекции, такие как отек или опухание, головная боль, лихорадка, усталость, озноб, гиперемия, головокружение, крапивница, одышка или стеснение в груди, тошнота, рвота, судороги, боль в спине, боль в суставах, мышечные судороги, судорожные припадки или конвульсии, изменения кровяного давления и анафилактические или тяжелые реакции гиперчувствительности, но не ограничиваясь этим. Как правило, при исследовании безопасности и переносимости лечения для оценки эффекта увеличения или уменьшения концентрации любой ADA2 или агентов, используемых в комбинированной терапии, в дозе, вводят диапазон доз и с разной частотой дозирования.

G. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

В настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие аденозиндезаминазу 2 (ADA2), такую как ADA2 дикого типа, ее варианты, конъюгаты или другие модифицированные формы, и фармацевтически приемлемый эксципиент или вспомогательный агент.

Фармацевтические композиции могут быть использованы для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с повышенными уровнями аденозина (*например,* гиперпролиферативное заболевание или состояние, такое как опухоль или рак). Любая ADA2 может быть введена в монотерапии или может быть введена в комбинированной терапии с другим агентом или лечением, описанным в настоящем документе. Композиции могут быть получены для однократного введения или для многократного введения. Агенты могут быть получены для прямого введения. Композиции могут быть предусмотрены в виде жидкой или лиофилизированной лекарственной формы.

Фармацевтически приемлемые композиции получают с учетом требований регулирующего агентства или другого агентства, составленных в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения на животных и на людях. Композиции могут быть получены в виде растворов, суспензий, порошков или лекарственных форм с замедленным высвобождением. Как правило, соединения составляются в фармацевтические композиции с использованием методов и методик, хорошо известных в данной области техники (смотрите, *например,* Ansel *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Fourth Edition, 1985, 126). Лекарственная форма должна соответствовать способу введения.

Композиции могут быть получены для введения любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая внутримышечное, внутривенное, внутрикожное, внутриочаговое введение, внутрибрюшинные инъекции, подкожное, внутриопухолевое, эпидуральное, назальное, пероральное, вагинальное, ректальное, местное, локальное, ушное, ингаляционное, буккальное (*например*, подъязычное) и чрескожное введение или любой способ. Другие способы введения также предусмотрены. Введение может быть локальным, местным или системным в зависимости от места лечения. Локальное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, с помощью локальной инфузии во время хирургического вмешательства, местным нанесением, например, в сочетании с повязкой на рану после хирургического вмешательства, с помощью инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозиториев или с помощью имплантата, но не

ограничиваясь этим. Композиции также можно вводить с другими биологически активными агентами, либо последовательно, либо с перерывами, либо в той же самой композиции. Введение также может включать системы контролируемого высвобождения, в том числе лекарственные формы с контролируемым высвобождением и устройства для контролируемого высвобождения, например, с помощью насоса.

Наиболее подходящий способ в любом конкретном случае зависит от ряда факторов, таких как характер заболевания, ход заболевания, тяжесть заболевания и конкретная используемая композиция. Фармацевтические композиции могут быть получены в дозированных формах, подходящих для каждого способа введения. В частности, композиции могут быть получены в виде любых подходящих фармацевтических препаратов для системного, внутрибрюшинного, перорального или прямого введения. Например, композиции могут быть получены для подкожного, внутримышечного, внутриопухолевого, внутривенного или внутрикожного введения. В некоторых вариантах воплощения композиции содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, такие как онколитические вирусные векторы или векторы для генной терапии, или клетки, такие как модифицированные иммунные клетки для адоптивной иммунотерапии, и конкретные композиции могут быть получены в виде дозированных форм, подходящих для конкретной композиции.

Способы введения могут быть использованы для уменьшения воздействия деградирующих процессов на активный агент, таких как протеолитическая деградация и иммунологическое вмешательство посредством антигенного и иммуногенного ответа. Примеры таких способов включают локальное введение в месте лечения или непрерывную инфузию (*например*, полипептида ADA2 или его варианта).

Соединения могут быть получены в виде подходящих фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, лекарственные формы с замедленным высвобождением или эликсиры для перорального введения, а также трансдермальные пластыри и порошковые ингаляторы. Как правило,

соединения получены в виде фармацевтических композиций с использованием методов и методик, известных в данной области техники (смотрите, *например,* Ansel *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, Fourth Edition, 1985, 126). Как правило, способ получения лекарственной формы является функцией способа введения. Как правило, композиции получены в лиофилизированной или жидкой форме. Если композиции предусмотрены в лиофилизированной форме, они могут быть восстановлены непосредственно перед применением соответствующим буфером, например, стерильным физиологическим раствором.

1. Лекарственные формы – жидкости, инъецируемые формы и эмульсии

Лекарственную форму обычно готовят в соответствии со способом введения. В настоящем документе предусмотрены парентеральное введение, обычно путем инъекции или инфузии, либо подкожное, внутримышечное, внутривенное или внутрикожное введение. Препараты для парентерального введения включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для комбинации с растворителем непосредственно перед применением, в том числе подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для комбинации со средой непосредственно перед применением и стерильные эмульсии. Инъецируемые лекарственные формы могут быть получены в традиционных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Лиофилизированные лекарственные формы идеально подходят для хранения больших однократных доз для более позднего использования или хранения.

В одном из примеров фармацевтические препараты могут быть в жидкой форме, например, в виде растворов, сиропов или суспензий. В жидкой форме, фармацевтические препараты могут быть предусмотрены в виде концентрированного препарата для разбавления до терапевтически эффективной концентрации перед применением. Фармацевтические препараты также могут

быть предусмотрены в дозированной форме, которая не требует разбавления перед применением. Такие жидкие препараты могут быть получены общепринятыми способами с фармацевтически приемлемыми вспомогательными агентами, такими как суспендирующие агенты (*например,* сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (*например,* лецитин или аравийская камедь); неводные носители (*например,* миндальное масло, жирные сложные эфиры или фракционированные растительные масла); и консерванты (*например,* метил или пропил-п-гидроксибензоаты или сорбиновая кислота). В другом примере фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной форме для восстановления водой или другой подходящей средой для лекарства перед применением.

Инъецируемые лекарственные формы разработаны для локального и системного введения. Инъецируемые лекарственные формы могут быть получены в традиционных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин или этанол. Препараты для парентерального введения включают стериальные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для комбинации с растворителем непосредственно перед применением, в том числе подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для комбинации со средой непосредственно перед применением и стерильные эмульсии. Растворы могут быть либо водными, либо неводными. При внутривенном введении, подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизирующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

Фармацевтические композиции могут включать носители или другие эксципиенты. Например, предусмотренные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать один или несколько

разбавителей, адъювантов, антиадгезионных агентов, связующих агентов, агентов для покрытия оболочкой, наполнителей, вкусоароматических агентов, красителей, смазывающих вещества, глидантов, консервантов, детергентов, сорбентов или подсластителей и любую их комбинацию или среду для лекарства, с которой вводят модифицированный полипептид PH20. Например, фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, используемые в парентеральных препаратах, включают водные среды для лекарства, неводные среды для лекарства, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, локальные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, связывающие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Лекарственные формы, в том числе, жидкие препараты, могут быть получены традиционными способами с фармацевтически приемлемыми вспомогательными агентами или эксципиентами.

Фармацевтические композиции могут включать носители, такие как разбавители, адъюванты, эксципиенты или среды для лекарств, с которыми вводятся композиция. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" автора E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения или агента, обычно в очищенной форме или частично очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для правильного введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода или масла, в том числе, минеральные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Вода представляет собой обычный носитель. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, в инъецируемых растворах. Композиции могут содержать наряду с активным ингредиентом: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, дикальция фосфат или карбоксиметилцеллюлоза; смазывающее вещество, такое как стеарат магния, стеарат кальция или тальк; и связывающий агент, такой как крахмал, природные

камеди, такие как аравийская камедь, желатин, глюкоза, меласса, поливинилпирролидон, целлюлоза и ее производные, повидон, кросповидоны и другие такие связывающие агенты, известные специалистам в данной области техники. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, декстрозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерина моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, солевой раствор, воду и этанол. Например, подходящими эксципиентами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин или этанол. Композиция, при необходимости, также могут содержать минорные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, например, ацетат натрия, сорбитан монолаурат, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, связывающие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры неводных сред для лекарств включают физиологический раствор для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонические инъекции декстрозы, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера с декстрозой и лактатом для инъекций. Неводные парентеральные среды для лекарств включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Антимикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены в парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, которые включают фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, бензалкония хлорид и бензетония хлорид. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты

включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаина гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают натрия карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие агенты включают Polysorbate 80 (TWEEN 80). Связывающий или хелатирующий ионы металлов агент включает EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

В частности, в препараты для парентерального введения, упакованные в многодозовые контейнеры, могут быть добавлены противомикробные агенты (*например,* консерванты) в бактериостатических или фунгистатических концентрациях (*например,* эффективное против микроорганизмов количество), которые включают фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, бензалкония хлорид и бензетония хлорид.

Фармацевтические композиции также могут содержать другие минорные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, например, ацетат натрия, сорбитан монолаурат, олеат триэтаноламина и циклодекстрины. Имплантация системы с медленным высвобождением или замедленным высвобождением, благодаря которой поддерживается постоянный уровень дозировки (смотрите, например, патент США номер 3,710,795), также рассматривается в настоящем документе. Процентное содержание активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, в большой степени зависит от его конкретной природы, а также от активности соединения и потребностей субъекта.

Лиофилизированные порошки

Представляющими интерес в настоящем документе являются лиофилизированные порошки, которые могут быть восстановлены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Они также могут быть восстановлены и получены в виде твердых лекарственных форм или гелей.

Лиофилизированные порошки также могут быть получены из любого из описанных выше растворов. Фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной форме для восстановления водой или другой подходящей средой до применения.

Стерильный лиофилизированный порошок получают путем растворения соединения в буферном растворе. Буферный раствор может содержать эксципиент, который улучшает стабильность или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией при стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивает получение желаемого препарата. Кратко, лиофилизированный порошок получают путем растворения эксципиента, такого как декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза или другой подходящий агент, в подходящем буфере, таком как, цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники. Далее выбранный фермент, агент или соединение добавляют к полученной смеси и перемешивают до полного его растворения. Полученную смесь фильтруют в стерильных условиях или обрабатывают для удаления частиц и обеспечения стерильность, и распределяют во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать однократную дозу (1 мг - 1 г, обычно 1-100 мг, например, 1-5 мг) или другие дозировки, описанные в настоящем документе или многократные дозы соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при температуре от примерно 4 °C до комнатной температуры.

Восстановление такого лиофилизированного порошка буферным раствором обеспечивает лекарственную форму для применения при парентеральном введении. Точное количество зависит от показаний, подлежащих лечению, и выбранного соединения. Такое количество может быть определено опытным путем.

2. Композиции для других способов введения

В зависимости от состояния, подлежащего лечению, также предусмотрены в настоящем документе другие способы введения, такие как,

местное применение, трансдермальные пластыри, пероральное и ректальное введение.

Например, фармацевтические дозированные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки для системного эффекта. Ректальные суппозитории включают твердые тела для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или несколько фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных суппозиториях представляют собой основы или носители и агенты для повышения температуры плавления. Примеры основ включают какао-масло (масло из какао-бобов), глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтилен гликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Могут быть использованы комбинации различных основ. Агенты для повышения температуры плавления суппозиториев включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории могут быть получены либо путем прессования, либо путем формования. Типичный вес ректального суппозитория составляет примерно от 2 до 3 г. Таблетки и капсулы для ректального введения изготавливают с использованием того же самого фармацевтически приемлемого вещества и теми же самыми способами, что и лекарственные формы для перорального введения. Лекарственные формы, подходящие для ректального введения могут быть предусмотрены в виде суппозиториев с однократной дозой. Они могут быть получены путем смешивания активного соединения с одним или несколькими обычными твердыми наполнителями, например, с какао-маслом, и путем последующего придания формы полученной смеси.

Для перорального введения, фармацевтические композиции могут принимать форму, например, таблеток или капсул, полученных обычными способами с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как, связывающие агенты (*например*, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); заполнители (*например*, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазывающие агенты (*например*, стеарат магния, тальк или диоксид кремния); разрыхлители

(*например*, картофельный крахмал или натрия крахмала гликолят); или смачивающие агенты (*например*, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты способами, хорошо известными в данной области техники.

Лекарственные формы, подходящие для буккального (сублингвального) введения включают, например, пастилки для рассасывания, содержащие активное соединение в ароматизированной основе, обычно в сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; и пастилки, содержащие соединение в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь.

Местные смеси готовят, как описано для локального и системного введения. Полученные смеси могут представлять собой растворы, суспензии, эмульсии или тому подобные смеси и могут быть получены в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, растворов для орошений, спреев, суппозиториев, бинтов, дермальных пластырей или любых других композиций, подходящих для местного введения.

Соединения или их фармацевтически приемлемые производные могут быть получены в виде аэрозолей для местного применения, таких как ингаляция (смотрите, *например,* патенты США номер 4,044,126, 4,414,209 и 4,364,923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, используемого для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы). Эти лекарственные формы для введения в респираторный тракт могут быть в виде аэрозоля или раствора для распылителя или в виде микродисперсного порошка для инсуффляции, отдельно или в сочетании с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы лекарственной формы будут, как правило, иметь диаметр менее 50 мкм или менее 10 мкм.

Соединения могут быть составлены в виде композиций для локального или местного применения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, такие как глаза, в виде гелей, кремов и лосьонов, и для нанесения на глаза или для интрацистернального или интраспинального применения. Местное введение предполагается для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционной

терапии. Также для введения могут использоваться интраназальные растворы только активного соединения или активного соединения в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Предусмотрены лекарственные формы, подходящие для трансдермального введения. Они могут быть предусмотрены в любом подходящем формате, например, в виде отдельных пластырей, приспособленных для тесного контакта с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Такие пластыри содержат активное соединение в необязательно забуференном водном растворе, например, с концентрацией активного соединения от 0,1 до 0,2 М. Лекарственные формы, подходящие для трансдермального введения также могут доставляться с помощью ионтофореза (смотрите, *например,* Tyle, P, *Pharmaceutical Research* 3(6):318-326 (1986)) и, как правило, предусмотрены в виде необязательно забуференного водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции также могут быть введены с помощью лекарственных форм с контролируемым высвобождением и/или устройств для доставки (смотрите, *например,* патенты США номер 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 и 5,733,566).

3. Дозировки и и способы введения

ADA2 в композиции, например, любая описанная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее вариант, конъюгат или другая модифицированная форма, может быть получена в виде фармацевтических композиций для однократного или многократного введения. Белок может быть включен в количестве, достаточном для достижения терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов у пациента, подвергаемого лечению. Например, концентрация фармацевтически активного соединения подбирается таким образом, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество для достижения желаемого фармакологического эффекта. Терапевтически эффективную концентрацию можно определить опытным путем, тестируя белок в известных *in vitro* и *in vivo* системах, например, с помощью анализов, описанных в настоящем документе, или

известных в данной области техники. Например, могут быть использованы стандартные клинические методы. Кроме того, чтобы облегчить определение оптимальных диапазонов доз могут быть использованы *in vitro* анализы и модели на животных. Точная доза, которая может быть определена опытным путем, может зависить от возраста, массы тела и состояния пациента или животного, конкретной вводимой молекулы ADA2, способа введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и тяжести заболевания.

Следовательно, понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения являются функцией заболевания, подвергаемого лечени, и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или путем экстраполяции из данных *in vivo* или *in vitro* анализов. Следует отметить, что значения концентраций и дозировок также могут варьировать в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо смягчить. Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением лица, осуществляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентраций, указанные в настоящем документе, приведены только с иллюстративной целью и не предназначены для ограничения объема или применений композиций и комбинаций, содержащих их. Композиции можно вводить каждый час, каждый день, каждую неделю, каждый месяц, каждый год или единожды. Как правило, режимы дозирования выбирают таким образом, чтобы ограничить токсичность. Следует отметить, что лечащий врач знает, как и когда прекратить, прервать или скорректировать терапию, чтобы снизить дозировку из-за токсичности или нарушений функционирования костного мозга, печени или почек или других тканей. Кроме того, лечащий врач также знает, как и когда скорректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (не допуская токсических побочных эффектов).

Композиции белка ADA2, такого как ADA2 дикого типа, ее вариант, конъюгат или другие модифицированные формы, включены в композицию в количестве, достаточном для достижения терапевтически полезного эффекта. Например, количеством может быть такое количество, при котором достигается

терапевтический эффект в лечении гиперпролиферативного заболевания или состояния, такого как рак. Обычно, композиции содержат от 0,5 мкг до 100 граммов белка ADA2, например, от 20 мкг до 10 граммов, от 20 мкг до 50 граммов, от 20 мкг до 1 граммов, от 20 мкг до 500 мг, от 20 мкг до 200 мг, от 20 мкг до 5 мг, от 20 мкг до 0.5 мг, от 0,5 мг до 100 граммов, от 0,5 мг до 10 граммов, от 0,5 мг до 5 граммов, от 0,от 5 мг до 1 грамма, от 0,от 5 мг до 500 мг, от 0,от 5 мг до 200 мг, от 0,от 5 мг до 5 мг, от 5 мг до 100 граммов, от 5 мг до 10 граммов, от 5 мг до 5 граммов, от 5 мг до 1 грамма, от 5 мг до 500 мг, от 5 мг до 200 мг, от 100 мг до 100 граммов, от 100 мг до 10 граммов, от 100 мг до 5 граммов, от 100 мг до 1 грамма, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 200 мг, от 200 мг до 100 граммов, от 200 мг до 10 граммов, от 200 мг до 5 граммов, от 200 мг до 1 грамма, от 200 мг до 500 мг, от 500 мг до 100 граммов, от 500 мг до 10 граммов, от 500 мг до 5 граммов, от 500 мг до 1 грамма, от 1 грамма до 100 граммов, от 1 грамма до 10 граммов, от 1 грамма до 5 граммов, от 5 граммов до 100 граммов, от 5 граммов до 10 граммов или от 10 граммов до 100 граммов. Например, композиция может содержать количество ADA2, которое составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или 1 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1 грамм, 5 граммов, 10 граммов, 20 граммов, 30 граммов, 40 граммов, 50 граммов, 60 граммов, 70 граммов, 80 граммов, 90 граммов, 100 граммов, 200 граммов, 300 граммов или больше.

В других примерах композиция содержит от или примерно от 1 миллиединицы (мЕд) до 10000 единиц (Ед), от 1 мЕд до 1000 Ед, от 1 мЕд до 100 Ед, от 1 мЕд до 10 Ед, от 1 мЕд до 1 Ед, от 1 мЕд до 100 мЕд, от 1 мЕд до 10 мЕд, от 10 мЕд до 10,000 Ед, от 10 мЕд до 1,000 Ед, от 10 мЕд до 100 Ед, от 10 мЕд до 10 Ед, от 10 мЕд до 1 Ед, от 10 мЕд до 100 мЕд, от 100 мЕд до 10000 Ед, от 100 мЕд до 1000 Ед, от 100 мЕд до 100 Ед, от 100 мЕд до 10 Ед, от 100 мЕд до 1 Ед, от 1 Ед до 10000 Ед, от 1 Ед до 1000 Ед, от 1 Ед до 100 Ед, от 1 Ед до 10 Ед, от 10 Ед до 10000 Ед, от 10 Ед до 1000 Ед, от 10 Ед до 100 Ед, от 100 Ед до 10000 Ед, от 100 Ед до 1000 Ед, от 1000 Ед до 10000 Ед ADA2. Например, композиция может содержать количество ADA2, которое составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или 1 мЕд, 2 мЕд, 3 мЕд, 4 мЕд,

5 мЕд, 6 мЕд, 7 мЕд, 8 мЕд, 9 мЕд, 10 мЕд, 20 мЕд, 30 мЕд, 40 мЕд, 50 мЕд, 60 мЕд, 70 мЕд, 80 мЕд, 90 мЕд, 100 мЕд, 200 мЕд, 300 мЕд, 400 мЕд, 500 мЕд, 600 мЕд, 700 мЕд, 800 мЕд, 900 мЕд, 1 Ед, 10Ед, 20 Ед, 30 Ед, 40 Ед, 50 Ед, 60 Ед, 70 Ед, 80 Ед, 90 Ед, 100 Ед, 200 Ед, 300 Ед, 400 Ед, 500 Ед, 600 Ед, 700 Ед, 800 Ед, 900 Ед, 1000 Ед, 2000 Ед, 3000 Ед, 4000 Ед, 5000 Ед, 6000 Ед, 7000 Ед, 8000 Ед, 9000 Ед, 10000 Ед или больше.

Объем композиции, содержащей ADA2, предусмотренную в настоящем документе, может быть или может быть примерно от 0,1 мл до 100 мл, например, от 0,5 мл до 100 мл, от 0,5 мл до 50 мл, от 0,5 мл до 10 мл, от 1 мл до 100 мл, от 1 мл до 50 мл, от 1 мл до 40 мл, от 1 мл до 20 мл, от 1 мл до 10 мл или от 3 мл до 10 мл. Как правило, объемы инъекций или инфузий композиции составляют, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 0,01 мл, 0,05 мл, 0,1 мл, 0,2 мл, 0.3 мл, 0,4 мл, 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл или больше.

Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, ADA2 дикого типа, ее варианты или конъюгат (например, пегилированная ADA2), может быть предусмотрена в концентрации, равной или примерно равной или, по меньшей мере, равной или, по меньшей мере, примерно равной 1 мЕд/мл, 10 мЕд/мл, 20 мЕд/мл, 10 мЕд/мл, 20 мЕд/мл, 30 мЕд/мл, 40 мЕд/мл, 50 мЕд/мл, 60 мЕд/мл, 70 мЕд/мл, 80 мЕд/мл, 90 мЕд/мл, 100 мЕд/мл, 200 мЕд/мл, 300 мЕд/мл, 400 мЕд/мл, 500 мЕд/мл, 600 мЕд/мл, 700 мЕд/мл, 800 мЕд/мл, 900 мЕд/мл, 1 Ед/мл, 2 Ед/мл, 3 Ед/мл, 4 Ед/мл, 5 Ед/мл, 6 Ед/мл, 7 Ед/мл, 8 Ед/мл, 9 Ед/мл, 10 Ед/мл, 20 Ед/мл, 30 Ед/мл, 40 Ед/мл, 50 Ед/мл, 100 Ед/мл, 150 Ед/мл, 200 Ед/мл, 250 Ед/мл, 400 Ед/мл, 500 Ед/мл, 1000 Ед/мл, 2000 Единиц/мл, 3000 Ед/мл, 4000 Ед/мл, 5000 Ед/мл, 6000 Ед/мл, 7000 Ед/мл, 8000 Ед/мл, 9000 Ед/мл или 10000 Ед/мл. Композиция может быть получена для непосредственного применения или для разбавления до эффективной концентрации перед применением.

Фармацевтически терапевтически активные соединения и их производные, как правило, получены и вводятся в виде однодозовых лекарственных форм или в виде многодозовых лекарственных форм. Каждая однократная доза содержит заранее установленное количество терапевтически активного соединения, достаточное для получения желаемого терапевтического

эффекта, совместно с необходимым фармацевтическим носителем, средой для лекарства или разбавителем. Однодозовые формы включают таблетки, капсулы, пиллюли, порошки, гранулы, стерильные растворы или суспензии для парентерального введения и растворы и суспензии для перорального введения и масляные эмульсии в воде, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных, но не ограничиваясь этим. Однодозовые формы могут содержаться в ампулах и шприцах или могут быть индивидуально упакованы в таблетки или капсулы. Однодозовые формы могут вводиться долями или кратно их долям. Многодозовая форма представляет собой множество идентичных однодозовых форм, упакованных в один контейнер для введения в виде отдельных однодозовых форм. Примеры многодозовых форм включают флаконы, бутылки таблеток или капсул или бутылки пинт или галлонов. Таким образом, многодозовая форма представляет собой множество однократных доз, которые не разделены в упаковке. Обычно, могут быть получены дозированные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне соотношений от 0,005% до 100% с нетоксичным носителем. Фармацевтическая композиция может быть получена в дозированных формах, подходящих для каждого способа введения.

Однодозовые парентеральные препараты упакованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Объем жидкого раствора или восстановленного порошкообразного препарата, содержащего фармацевтически активное соединение, зависит от заболевания, подлежащего лечению, и конкретного готового изделия, выбранного для упаковки. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и практикуется в данной области.

Как указано, композиции, предусмотренные в настоящем документе, могут быть получены для любого способа введения, известного специалистам в данной области, в том числе для подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрикожного, внутриочагового введения, внутрибрюшинной инъекции, эпидурального, вагинального, ректального, локального, ушного, трансдермального введения или любого способа введения. Лекарственные формы, подходящие для таких способов, известны специалистам в данной

области техники. Композиции также могут быть введены с другими биологически активными агентами, либо последовательно, либо с перерывами, либо в той же самой композиции.

Фармацевтические композиции могут быть введены с помощью лекарственных форм с контролируемым высвобождением и/или устройств для доставки (смотрите, например, патенты США номер 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,660; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,556; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 и 5,733,566).

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения выбранных композиций, такие как инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный рецепторами эндоцитоз и доставка молекул нуклеиновых кислот, кодирующих выбранные ADA2, такие как ADA2 дикого типа, ее варианты или модифицированные формы, или другие агенты, такие как ретровирусные системы доставки, но не ограничиваясь этим. В некоторых вариантах воплощения композиции содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, такие как онколитические вирусные векторы или векторы для генной терапии, или клетки, такие как модифицированные иммунные клетки для адоптивной иммунотерапии, и конкретные композиции могут быть введены в системах доставки, подходящих для конкретной композиции.

Таким образом, в некоторых вариантах воплощения липосомы и/или наночастицы также могут быть использованы совместно с введением композиций и комбинаций по настоящему документу. Липосомы образованы фосфолипидами, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические бислойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 мкМ. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию маленьких однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 ангстрем, содержащих водный раствор в ядре. В некоторых вариантах воплощения липосомы могут представлять собой мультивезикулярные липосомы (MVL).

При диспергировании в воде фосфолипиды могут образовывать различные структуры, отличные от липосом, в зависимости от молярного соотношения липид/вода. При низких соотношениях липид/вода образуются липосомы. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Липосомы могут демонстрировать низкую проницаемость для ионных и полярных веществ, но при повышенных температурах происходит фазовый переход, который значительно изменяет их проницаемость. Фазовый переход связан с изменением от плотно упакованной, упорядоченной структуры, известной как состояние геля, до неплотно упакованной, менее упорядоченной структуры, известной как жидкое состояние. Это происходит при характерной температуре фазового перехода и приводит к увеличению проницаемости для ионов, сахаров и лекарственных средств.

Липосомы взаимодействуют с клетками посредством различных механизмов: эндоцитоз фагоцитирующими клетками ретикулоэндотелиальной системы, такими как, макрофаги и нейтрофилы; адсорбция на поверхности клетки, либо за счет неспецифичных слабых гидрофобных или электростатических сил, либо за счет специфичных взаимодействий с компонентами поверхности клетки; слияние с плазматической мембраной клетки путем внедрения липидного бислоя липосомы в плазматическую мембрану, с одновременным высвобождением содержимого липосом в цитоплазму; и переноса липосомальных липидов в клеточные или субклеточные мембраны, или, наоборот, без какой-либо ассоциации содержимого липосом. Варьирование композиции липосомы может приводить к изменению действующего механизма, хотя одновременно действует больше одного механизма. Нанокапсулы обычно могут удерживать соединения стабильным и воспроизводимым способом. Чтобы избежать побочных эффектов, связанных с внутриклеточной полимерной перегрузкой, такие ультрамелкие частицы (размером около 0.1 мкМ) должны быть разработаны с использованием полимеров, которые могут деградировать *in vivo*. Биодеградируемые полиалкил-цианакрилатные наночастицы, которые удовлетворяют этим требованиям, рассматриваются для применения в настоящем документе, и такие частицы могут быть легко получены.

4. Упаковка и готовые изделия

Также предусмотрены готовые изделия, содержащие упаковочные материалы, любую фармацевтическую композицию, предусмотренную в настоящем документе, и этикетку, на которой указано, что композиции должны использоваться для лечения заболеваний или состояний, как описано здесь. Например, на этикетке может быть указано, что лечение проводится для опухоли или рака. Этикетка также может содержать указание о том, что лечение относится к заболеванию или состоянию, ассоциированному с повышенным уровнем маркера, как описано в настоящем документе, например повышенными или накопленными уровнями аденозина в тканях или клетках, повышенными уровнями аденозинрецептора (ADR) и/или повышенными уровнями CD73 или CD39.

Комбинации белка ADA2, предусмотренные в настоящем документе, в том числе его варианта, конъюгата (*например,* пегилированная ADA2) или другой модифицированной формы, и другого терапевтического агента также могут быть упакованы в готовое изделие. В одном из примеров готовое изделие содержит фармацевтическую композицию, содержащую ADA2, такую как любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, и не содержит другой агент или не подразумевает другого лечения. В других примерах готовое изделие содержит фармацевтическую композицию, содержащую ADA2 и другой дополнительный терапевтический агент. Например, готовое изделие содержит фармацевтическую композицию, содержащую ADA2 и другое лечение, например, ингибитор иммунных контрольных точек или противоопухолевый агент. В этом примере агенты могут быть предусмотрены совместно или по отдельности для упаковки в виде готовых изделий.

Предусмотренные в настоящем документе готовые изделия содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для применения в упакованных фармацевтических продуктах хорошо известны специалистам в данной области техники. Смотрите, например, патенты США номер 5,323,907, 5,052,558 и 5,033,252, каждый из которых включен в настоящий документ во всей своей полноте. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают блистерные упаковки, бутылки, тубы, ингаляторы, помпы, мягкие

контейнеры, флаконы, контейнеры, шприцы, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранной лекарственной формы и предполагаемого способа введения и лечения, но не ограничиваясь этим. Примерами готовых изделий являются контейнеры, в том числе однокамерные и двухкамерные контейнеры. Контейнеры включают тубы, бутылки и шприцы, но не ограничиваясь этим. Контейнеры могут дополнительно включать иглу для внутривенного введения.

Выбор упаковки зависит от агентов и от того, будут ли такие композиции упакованы вместе или отдельно. В общем, упаковка не реагирует с композициями, содержащимися в ней. В других примерах некоторые компоненты могут быть упакованы в виде смеси. В других примерах все компоненты упакованы по отдельности. Таким образом, например, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций, которые при смешивании непосредственно перед введением могут непосредственно вводиться совместно. Альтернативно, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций для введения отдельно.

Выбранные композиции, в том числе их готовые изделия, также могут быть предусмотрены в виде наборов. Наборы могут включать фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и элемент набора для введения, предусмотренный в виде готового изделия. Например, ADA2 может поставляться с устройством для введения, таким как шприц, ингалятор, дозатор, капельница или аппликатор. Композиции могут содержаться в элементе набора для введения или могут быть предусмотрены отдельно для добавления позднее. Набор может, необязательно, включать инструкции по применению, включая дозировки, режимы дозирования и инструкции для способов введения. Наборы также могут включать описанную в настоящем документе фармацевтическую композицию и элемент набора для диагностики.

H. СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗОЙ 2 (ADA2)

Способы, предусмотренные в настоящем документе, включают способы введения или применения любой аденозиндезаминазы 2 (ADA2), описанной в настоящем документе, например, дикого типа, ее варианта, конъюгата (например, пегилированной ADA2) или других модифицированных форм, для

лечения субъектов с заболеванием или состоянием, симптомы которых могут быть улучшены или ослаблены за счет снижения уровней аденозина или дезоксиаденозина у субъекта. Например, заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, связанное с повышенными уровнями аденозина. Например, поскольку ADA2 обладает низкой аффинностью связывания в отношении аденозина с Km, равной примерно 200 x 10^{-5} M, ADA2 преимущественно проявляет активность в условиях повышенных или высоких уровней аденозина. Таким образом, применение ADA2 в качестве терапевтического агента обеспечивает преимущество, заключающееся в специфичности в отношении заболевания или нездорового окружения, и отсутствии активности в нормальном окружении, в котором уровни аденозина ниже. В конкретных примерах, как описано ниже, заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. Субъект может быть выбран на основании уровней внеклеточного аденозина, уровня экспрессии аденозинового рецептора (ADR) и/или уровня экспрессии эктонуклеотидазы. Дополнительно также предусмотрены способы комбинированной терапии с одним или несколькими дополнительными агентами для лечения, такими как противораковый агент или антигиалуронановый агент.

1. Примеры заболевания и состояний

Концентрации аденозина, которые физиологически на низких уровнях присутствуют в интерстициальных жидкостях не подвергнутых стрессу тканей, могут быстро повышаться в ответ на патологические состояния, такие как гипоксия, ишемия, опухолевое окружение или травма. При высвобождении во внеклеточное пространство, аденозин функционирует в качестве сигнала опасности и посредством активации аденозиновых рецепторов (ADR), в результате чего возникают различные клеточные ответы для восстановления тканевого гомеостаза. Аденозин связан с различными активностями, которые могут вносить вклад в этиологию заболеваний и состояний, включая стимуляцию роста опухоли и ангиогенез, ингибирование синтеза цитокинов и адгезии иммунных клеток к эндотелиальной стенке, ингибирование функции Т-клеток, макрофагов и естественных киллеров, а также способствование метастазированию опухолей, но не ограничиваясь этим.

Аденозиндезаминазы, такие как любая ADA2 или ее варианты, конъюгаты или другие модифицированные формы, описанные в настоящем документе, могут модулировать внеклеточные уровни аденозина в таких условиях за счет дезаминирования молекул аденозина с образование инозина. Следовательно, любые такие заболевания можно лечить с помощью ADA2, описанной в настоящем документе, например, дикого типа, ее варианта, конъюгата (например, пегилированной ADA2) или другой модифицированной формы. В частности, ADA2 обладает свойством, которое придает ей стабильность во внеклеточных условиях, таким как интенсивное гликозилирование и наличие консервативных дисульфидных связей, что делает ее желательным терапевтическим агентом. В настоящем документе предусмотрены примеры заболеваний и состояний, для лечения которых может использоваться ADA2.

Композиции, содержащие ADA2, могут быть введены любым способом, желательным для лечения заболевания или состояния. Конкретный способ введения может зависеть от конкретного заболевания или состояния, тяжести заболевания или состояния, конкретной лекарственной формы и других факторов, известных специалисту в данной области техники. Как правило, композиции вводятся внутривенно, хотя другие способы введения предусмотрены, например, любой способ введения, известный специалисту в данной области техники, включая внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, внутрикожное, внутриочаговое введение, внутрибрюшинные инъекции, эпидуральное, вагинальное, ректальное, местное, ушное, чрескожное введение или любой способ введения.

a. Рак и опухоли

ADA2, такая как любая описанная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или другая модифицированная форма, может использоваться для лечения опухоли или рака. Высокие внеклеточные уровни аденозина в опухолевых микроокружениях (TME) создают локальное иммуносупрессирующее окружение, и супрессируют активность Т-клеток и NK клеток. Из-за создания иммуносупрессирующего TME и сигналинга от ADR к специфичным опухолевым и иммунным клеткам,

аденозин обычно создает TME, которое благоприятно для роста, васкуляризации и метастазирования опухоли.

Было показано, что агенты, которые модулируют сигналинг аденозина, оказывают влияние на ингибирование роста опухоли и модулирование нисходящего клеточного сигналинга при различных типах рака, таких как рак груди, рак легких, карцинома толстой кишки, рак предстательной железы и клетки меланомы (Antonioli *et al.* (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Аденозиндезаминазы, такие как любая ADA2 или ее варианты, конъюгаты или модифицированные формы, описанные в настоящем документе, могут модулировать внеклеточные уровни аденозина в опухолевом окружении, за счет дезаминирования молекул аденозина с образованием инозина. Таким образом, любая ADA2, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или модифицированные формы, могут быть использованы в качестве агента для модуляции уровней аденозина и сигналинга, подавления иммуносупрессии противоопухолевого иммунного ответа и, в конечном счете, для снижения роста опухоли.

В частности, заболевания и состояния, которые можно лечить или облегчать способами, предусмотренными в настоящем документе, включают, например, заболевания и состояния, при которых рост опухоли стимулируется высокой концентрацией аденозина и/или сигналингом от аденозиновых рецепторов (ADR). Например, TME, которое активно продуцирует высокие концентрации аденозина, тем самым создавая локальное иммуносупрессирующее окружение, может быть более подвержено лечению ADA2. По сравнению с нормальными уровнями аденозина, являющимися примерно или приблизительно 0,1 микромолярными, уровни аденозина в TME повышены до примерно 10 микромолей. Поскольку ADA2 имеет высокую Km, она преимущественно активна в условиях с повышенным содержанием аденозина, которые обычно встречаются в опухолевом микроокружении (TME), ADA2 может снижать уровни аденозина в TME за счет своей активности аденозиндезаминазы. Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе ADA2 дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть использована для лечения опухолей, в том числе солидных опухолей, с

высокой концентрацией аденозина в TME.

Кроме того, как показано в настоящем документе, ADA2 или ее варианты, также имеют разный оптимум pH, что позволяет им преимущественно действовать в целевых областях в TME. Например, гипоксические области TME обычно имеют низкий pH, равный примерно или приблизительно pH 6,5, который соответствует оптимуму pH ADA2. Например, измененный pH типичен для микроокружения при заболеваниях, такого как TME (смотрите, *например,* Fogh Andersen *et al.* (1995) *Clin. Chem.*, 41:1522-1525; Bhujwalla *et al.* (2002) *NMR Biomed.*, 15:114-119; Helmlinger *et al.* (1997) *Nature Med.*, 3:177; Gerweck and Seetharaman (1996), Cancer Res. 56(6):1194-1198). Например, во многих опухолях за счет эффекта Варбурга создается микроокружение с диапазоном pH от примерно 5,6 до примерно 6,8, например, меньше чем, или примерно, или pH 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6,6, 6,7 или 6,8. Таким образом, ADA2, которая более активна при кислом pH, чем при нейтральном pH, например, ADA2 дикого типа или ее варианты, описанные в настоящем документе, может быть использована для лечения опухолей с низким pH в TME, при этом ее активность в нецелевых пораженных клетках или тканях будет минимизирована.

Таким образом, введение любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, для снижения концентрации аденозина в TME за счет ферментативного превращения аденозина в инозин, может быть использовано для предотвращения роста и метастазирования опухоли, при этом активность ADA2 в нецелевых пораженных клетках или тканях будет минимизирована.

В настоящем документе предусмотрены способы, применимые для лечения всех типов опухолей, включая рак, которые связаны с повышенными уровнями аденозина и/или чувствительны к снижению уровней аденозина или дезоксиаденозина у субъекта, подлежащего лечению. В широком смысле, они включают опухоли крови, а также солидные опухоли. Опухоли включают те опухоли, рост которых супрессируется при снижении уровней аденозина. Опухоли включают те опухоли, в которых снижение уровней аденозина позволяет иммунной системе субъекта более эффективно супрессировать рост опухоли, и/или те опухоли, рост которых супрессируется, когда снижение

уровней аденозина ингибирует кровоснабжение, например, гипоксические опухоли. В частности, солидные опухоли чувствительны к лечению способами, предусмотренными в настоящем документе, поскольку они более чувствительны к снижению ангиогенеза опухоли, возникающего в результате снижения уровней аденозина. Высокие уровни аденозина в участках TME способствуют ангиогенезу, и снижение уровней аденозина с помощью способов, предусмотренных в настоящем документе, может приводить к снижению ангиогенного эффекта аденозина. Кроме того, высокие уровни аденозина и активность CD73 связаны с диссеминацией и метастазированием раковых клеток. Таким образом, снижение уровней аденозина, осуществляемое за счет введения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может приводить к супрессии диссеминации и метастазирования раковых клеток.

Опухоли, подходящие для лечения способами, предусмотренными в настоящем документе, включают опухоли, которые развиваются в иммунной системе, скелетной системе, мышцах и сердце, груди, желудочно-кишечном тракте, центральной и периферической нервных системах, выделительной системе, репродуктивной системе, дыхательной системе, коже, соединительных тканях, включая суставы, жировых тканях и кровеносной системе, включая стенки кровеносных сосудов, но не ограничиваясь этим. Примеры опухолей, которые можно лечить введением любой ADA2 или ее варианта или модифицированной формы, предусмотренных в настоящем документе, включают карциномы, глиомы, саркомы (в том числе, липосаркомы), аденокарциномы, аденосаркомы и аденомы. Такие опухоли могут возникать практически во всех частях тела, включая, например, грудь, сердце, легкие, тонкую кишку, толстую кишку, селезенку, почки, мочевой пузырь, голову и шею, яичник, предстательную железу, мозг, поджелудочную железу, кожу, кости, костный мозг, кровь, тимус, матку, яички, шейку матки или печень.

Опухоли скелетной системы включают, например, саркомы и бластомы, такие как остеосаркома, хондросаркома и хондробластома. Опухоли мышц и сердца включают опухоли как скелетных мышц, так и гладких мышц, например, лейомиомы (доброкачественные опухоли гладких мышц), лейомиосаркомы, рабдомиомы (доброкачественные опухоли скелетных мышц), рабдомиосаркомы,

саркому сердца. Опухоли желудочно-кишечного тракта включают, например, опухоли полости рта, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки и колоректальные опухоли, а также опухоли желудочно-кишечных секреторных органов, таких как слюнные железы, печень, поджелудочная железа и желчные пути. Опухоли центральной нервной системы включают опухоли головного мозга, сетчатки и спинного мозга, а также могут возникать в ассоциированной соединительной ткани, костях, кровеносных сосудах или нервной ткани. Лечение опухолей периферической нервной системы также предусмотрено. Опухоли периферической нервной системы включают злокачественные опухоли периферических нервных стволов. Опухоли выделительной системы включают опухоли почек, например, почечно-клеточную карциному, а также опухоли мочеточника и мочевого пузыря. Опухоли репродуктивной системы включают опухоли шейки матки, матки, яичника, предстательной железы, яичек и связанных секреторных желез. Опухоли иммунной системы включают как опухоли крови, так и солидные опухоли, в том числе лимфомы, например, как ходжкинские, так и неходжкинские лимфомы. Опухоли дыхательной системы включают опухоли носовых проходов, бронхов и легких. Опухоли груди включают, например, как лобулярную карциному, так и дуктальную карциному.

Другие примеры опухолей, которые можно лечить с помощью любой ADA2 или ее вариантов или модифицированной формы, предусмотренных в настоящем документе, включают саркому Капоши, новообразования ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и церебральные метастазы, меланому, гастроинтестинальные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому (такую как мультиформная глиобластома) и лейомиосаркому. Примеры видов рака, которые можно лечить с помощью любой ADA2 или ее вариантов или модифицированной формы, предусмотренных в настоящем документе, включают лимфому, бластому, нейроэндокринные опухоли, мезотелиому, шванному, менингиому, меланому и лейкемию или лимфоидные злокачественные опухоли. Примеры таких видов рака включают гематологические злокачественные опухоли, такие как ходжкинская лимфома; неходжкинские лимфомы (лимфома Беркитта, лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз,

лимфома из клеток мантийной зоны, фолликулярная лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома из клеток маргинальной зоны, лейкоз ворсистых клеток и лимфоплазмоцитарный лейкоз), опухоли клеток-предшественников лимфоцитов, в том числе В-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфома и Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфома, тимома, опухоли зрелых Т-клеток и NK клеток, в том числе лейкоз периферических Т-клеток, Т-клеточный лейкоз взрослых/Т-клеточная лимфома взрослых и лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, гистиоцитоз клеток Лангерганса, миелоидные неоплазии, такие как острый миелоидный лейкоз, в том числе AML с созреванием, AML без дифференциации, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз, миелодиспластический синдром и хронические миелопролиферативные расстройства, в том числе хронический миелолейкоз; опухоли центральной нервной системы, такие как глиома, глиобластома, нейробластома, астроцитома, медуллобластома, эпендимома и ретинобластома; солидные опухоли головы и шеи (например, рак носоглотки, карцинома слюнных желез и рак пищевода), легких (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легких и плоскоклеточный рак легкого), пищеварительной системы (например, рак желудочно-кишечного тракта или желудка, в том числе гастроинтестинальный рак, рак желчных протоков или желчевыводящих путей, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак и анальная карцинома), репродуктивной системы (например, рак яичка, пениса или рак предстательной железы, рак матки, влагалища, вульвы, шейки матки, яичников и рак эндометрия), кожи (например, меланома, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточный рак, актинический кератоз, кожная меланома), печени (например, рак печени, печеночная карцинома, гепатоцеллюлярный рак и гепатома), кости (например, остеокластома и остеолитические костные опухоли), дополнительных тканей и органов (например, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, почки, рак щитовидной железы, рак груди, рак брюшной полости и саркома Капоши), опухоли сосудистой системы (например, ангиосаркома и гемангиоперицитома), опухоль Вильмса, ретинобластому, остеосаркому и саркому Юинга, но не

ограничиваясь этим.

b. Нераковые гиперпролиферативные заболевания

Любая ADA2, описанная в настоящем документе, например, дикого типа, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или другая модифицированная форма, может быть использована для лечения неракового гиперпролиферативного заболевания у субъекта. Аденозин и сигналинг от ADR играет роль в различных сигнальных путях, которые включают рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), сигналинг через циклический AMP (cAMP) и/или сигналинг через цитокины, а также в различных клеточных ответах, таких как активация митоген-активируемой протеинкиназы, транскрипция гена и пролиферация. Активация некоторых аденозиновых рецепторов (ADR), таких как рецептор A1, может привести к инициации клеточного сигнального пути, который приводит к клеточной пролиферации. Сверхэкспрессия и/или сверхстимуляция могут приводить к гиперпролиферации. Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть использована для лечения нераковых гиперпролиферативных расстройств за счет снижения активации ADR в клетках, вовлеченных в гиперпролиферативные расстройства.

Примеры гиперпролиферативных заболеваний, которые можно лечить любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантами и модифицированными формами, предусмотренными в настоящем документе, включают любые гиперпролиферативные заболевания, в том числе, например, псориаз, актинический кератоз и себорейный кератоз, бородавки, келоидные рубцы и экзему. Также включены гиперпролиферативные заболевания, вызываемые вирусными инфекциями, такими как инфекция вируса папилломы. Различные типы псориаза могут характеризоваться, например, гнойными пузырьками (пустулезный псориаз), сильным шелушением кожи I (эритродермический псориаз), каплевидными точками (каплевидный псориаз) и гладкими воспалительными повреждениями (обратный псориаз). Понятно, что лечение псориаза включает лечение всех типов псориаза (например, обыкновенный псориаз, пустулезный псориаз, эритродермический псориаз, артропатический псориаз, парапсориаз, ладонно-подошвенный пустулезный псориаз).

c. Фиброзные заболевания

Любая ADA2, описанная в настоящем документе, например, дикого типа, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или другая модифицированная форма, может быть использована для лечения фиброзных заболеваний, и, в частности, тех, которые ассоциированы с повышенным уровнем аденозина. Уровни аденозина повышаются в стрессовых условиях, таких как гипоксия, ишемия, воспаление, опухолевое окружение или травма. В этих условиях, внеклеточный аденозин является сигналом опасности и запускает различные ответы для поддержания гомеостаза ткани. Тем не менее, сохранение повышенной концентрации аденозина после острой фазой ответа на повреждение может стать вредным для тканей, поскольку активируются пути, которые вызывают подавление иммунитета или способствуют неконтролируемому процессу заживления раны, что приводит к фиброзному ремоделированию (Antonioli *et al.* (2013) Nat Rev Can 13:842-857). Введение ADA2, предусмотренной в настоящем документе, которое может привести к снижению связанного со стрессом накопления внеклеточного аденозина, может быть использовано для лечения заболеваний или состояний, связанных с чрезмерным отложением фиброзной ткани, таких как фиброз, образованием избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани в ходе репаративного или реактивного процесса. Заболевания или состояния, связанные с фиброзом, включают, например, фиброз легких, в том числе идиопатический фиброз легких и кистозный фиброз; фиброз печени, в том числе цирроз; фиброз сердца, в том числе эндомиокардиальный фиброз, инфаркт миокарда, фиброз предсердия; и другие фиброзные состояния, включая медиастинальный фиброз (фиброз мягкой ткани средостения), миелофиброз (фиброз костного мозга), ретроперитонеальный фиброз (фиброз мягких тканей ретроперитонеального пространства), массивный прогрессивный фиброз (фиброз легких), нефрогенный системный фиброз (фиброз кожи), болезнь Крона (фиброз кишечника), келоид (фиброз кожи), склеродермия/системный склероз (фиброз кожи, легких), артрофиброз (фиброз колена, плеча, других суставов), болезнь Пейрони (фиброз пениса), контрактура Дюпюитрена (фиброз рук, пальцев) и адгезивный капсулит плеча (фиброз плеча).

d. Инфекционные заболевания

Любая ADA2, описанная в настоящем документе, например, дикого типа, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или другая модифицированная форма, может быть использована для лечения инфекционных заболеваний, связанных с повышенным уровнем аденозина. Инвазивные патогены могут использовать эндогенные иммуносупрессирующие механизмы хозяина, такие как опосредованная аденозином иммуносупрессия, для распространения или выживания в организме хозяина. Например, из гифов *Candida albicans* высвобождается аденозин, который супрессирует опосредованный нейтрофилами киллинг организма, *Staphylococcus aureus* также продуцируют аденозин, чтобы супрессировать иммунный ответ хозяина. Кроме того, повышенная восприимчивость к инфекциям у новорожденных и пожилых людей также связана с повышенным сигналингом от аденозина (Hasko *et al.* (2013) Front Immunol. 4:85).

Поэтому при некоторых инфекционных заболеваниях ADA2 можно использовать в качестве лечения для снижения опосредованной аденозином иммуносупрессии. Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может использоваться для лечения инфекционных заболеваний. Инфекционные заболевания, которые можно лечить любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают заболевания, вызываемые такими патогенами как вирусы, бактерии, грибы, простейшие и паразиты, но не ограничиваясь этим. Инфекционные заболевания также могут вызываться вирусами, в том числе аденовирусом, цитомегаловирусом, вирусом лихорадки Денге, вирусом Эпштейна-Барра, хантавирусом, вирусом гепатита A, вирусом гепатита B, вирусом гепатита C, вирусом простого герпеса I типа, вирусом простого герпеса II типа, вирусом иммунодефицита человека (HIV), вирусом папилломы человека (HPV), вирусом гриппа, вирусом кори, вирусом эпидемического паротита, паповавирусом, полиовирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом чумы, риновирусом, ротавирусом, вирусом краснухи, SARS вирусом, вирусом натуральной оспы и вирусным менингитом. Инфекционные заболевания также могут вызываться бактериями, в том числе *Bacillus anthracis, Borrelia*

burgdorferi, Campylobacter jejuni, Chlamydia trachomatis, Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Diphtheria, Escherichia coli, Legionella, Helicobacter pylori, Mycobacterium rickettsia, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma Neisseria, Pertussis, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus, Staphylococcus, Vibrio cholerae и *Yersinia pestis.* Инфекционные заболевания также могут вызываться грибами, такими как *Aspergillus fumigatus, Blastomyces dermatitidis, Candida albicans, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum* и *Penicillium marneffei.* Инфекционные заболевания также могут вызываться простейшими и паразитами, такими как хламидии, кокзидиозы, лейшмании, малярийный плазмодий, риккетсии и трипаносомы.

e. Другие заболевания и состояния

У индивидуумов, которые несут вредные мутации в гене ADA1, могут развиваться иммунодефицитные расстройства разной степени, от легких до тяжелых. Такое иммунодефицитное расстройство обусловлено токсическим накоплением субстратов ферментов, аденозина и дезоксиаденозина в незрелых лимфоидных клетках. Расстройство может возникать как в раннем детстве, так и у взрослых, в зависимости от наследуемых мутаций. Дефицит ADA1 является одной из основных причин, вызывающих тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) у детей и ADA1 является одной из главных мишеней для генной терапии (R. Parkman *et al.*, 2000, "Gene therapy for adenosine deaminase deficiency", *Ann. Rev. Med.,* 51:33-47).

ADA2, предусмотренная в настоящем документе, например, дикого типа, ее вариант, конъюгат (например, пегилированная ADA2) или другие модифицированные формы, могут быть использованы для лечения SCID или других ADA1-опосредованных иммунодефицитов. Иммунодефициты обычно характеризуются либо как приобретенные иммунодефициты, либо как наследственные иммунодефициты. Приобретенные иммунодефициты включают инфекцию вируса иммунодефицита человека-1 (HIV-1), инфекции вирусов герпеса, инфекции вируса Эпштейна-Барра, лепроматозную лепру и снижение иммунитета, возникающее вследствие ожогов кожи у пациентов, т.е., ожоговый иммунодефицит. Наследственные иммунодефициты включают генетически различные формы SCID, в том числе SCID, связанные с дефицитом

аденозиндезаминазы (ADA SCID), аутосомно-рецессивный SCID с и без B-клеток (нет дефицита ADA), X-сцепленный рецессивный SCID без B-клеток, аутосомно-рецессивный SCID (есть дефицит ADA), дефицит фосфорилазы пуриновых нуклеотидов (PNP SCID), тяжелый комбинированный иммунодефицит (дефицит рецептора IL-2; т.е., X-сцепленный SCID) и синдром «голых» лимфоцитов. Другие иммунодефициты включают различные формы врожденных или генетически обусловленных гематопоэтических аномалий, несколько форм лейкозов высокого риска и несколько форм тяжелой угрожающей жизни апластической анемии. Также другие иммунодефициты, которые можно лечить, включают синдром Вискотта-Олдрича; синдром Даймонда-Блекфана; анемию Фанкони; тяжелую нейтрофильную дисфункцию; хроническое гранулематозное заболевание детей; тяжелый (Костмана) агранулоцитоз; иммунодефицит и нейтропению при хрящево-волосяной гипоплазии; детский остеопороз и остеопороз с поздним началом; апластическую анемию - из-за токсичных химикатов, идиопатическую, иммунологическую и генетическую (не Фанкони); острый миелоидный лейкоз; хронический миелоидный лейкоз; лимфому Беркитта и рецидивирующую острую лимфатическую лейкемию. В конкретных примерах, расстройства иммунной системы, подвергающиеся лечению, представляют собой тяжелый комбинированный иммунодефицит, зависимый от дефицита аденозиндезаминазы (ADA SCID).

2. Способы выбора пациентов

В настоящем документе предусмотрены способы выбора пациентов для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на уровне аденозин-ассоциированных биомаркеров, описанных в настоящем документе. Примеры аденозин-ассоциированных биомаркеров включают уровни аденозина в плазме, уровни аденозиновых рецепторов (ADR) и уровни эктонуклеотидазы.

Например, субъекты с повышенными уровнями аденозина в плазме или других образцах, могут быть более восприимчивы к лечению с использованием ADA2, поскольку введение ADA2 напрямую снижает повышенные уровни внеклеточного аденозина. В другом примере, субъекты с повышенными или

высокими уровнями экспрессии ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B в образцах, таких как образец опухоли, могут быть более восприимчивы к лечению с использованием ADA2, поскольку эффекты на аденозин и рост опухоли могут быть напрямую опосредованы связыванием с ADR, экспрессируемыми на опухолевых клетках. В следующем примере, субъекты с повышенными уровнями или уровнями экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в образце опухоли или другом образце, могут быть более восприимчивы к лечению с использованием ADA2, поскольку увеличение экспрессии CD39 и CD73 приводит к повышению уровней аденозина, а повышение уровней аденозина и сигналинга через ADR далее стимулирует развитие рака. Таким образом, эти биомаркеры могут быть использованы для выбора или идентификации пациентов, которые предположительно будут отвечать на лечение и/или подойдут для мониторинга лечения и эффективности лечения, что обеспечивает улучшенную схему лечения аденозин-ассоциированных заболеваний или состояний, таких как опухоль или рак, с использованием любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

a. Аденозин-ассоциированные биомаркеры

В настоящем документе предусмотрены способы выбора пациентов с опухолями, к которым может быть применимо лечение ADA2. В настоящем документе предусмотрены способе, применимые для лечения состояний и заболеваний, связанных с повышенными уровнями аденозина и/или чувствительных к снижению уровней аденозина или дезоксиаденозин у субъекта, подлежащего лечению. Например, такие состояния или заболевания включают опухоль или рак. Уровни аденозин-ассоциированных биомаркеров, например, уровни аденозина в плазме, уровни аденозинового рецептора (ADR) и уровни эктонуклеотидазы, могут быть использованы для диагностики или прогнозирования аденозин-ассоциированного заболевания или состояния, для предсказания реакции субъекта, имеющего аденозин-ассоциированное заболевание или состояние, на любую терапию с помощью ADA2 или комбинированную терапию, предусмотренную в настоящем документе, и/или для мониторинга или предсказания эффективности лечения субъекта, имеющего аденозин-ассоциированное заболевание или состояние, которое лечили ADA2,

предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантами и модифицированными формами.

В любых примерах в настоящем документе, аденозин-ассоциированные заболевания или состояния представляют собой заболевания и состояния, при которых уровни аденозина повышаются, являясь причиной, следствием или иначе связаны с заболеванием или состоянием. Примеры аденозин-ассоциированных заболеваний или состояний включают рак, опухоль, воспалительное заболевание, инфекцию и другие состояния и заболевания, связанные с повышенными уровнями аденозина и/или чувствительных к снижению уровней аденозина или дезоксиаденозина у субъекта, подлежащего лечению. В частности, аденозин-ассоциированные заболевания и состояния включают рак с повышенными уровнями аденозина во внеклеточной среде, например, опухоли, в том числе солидные опухоли, являющиеся гипоксическими, но не ограничиваясь этим. В настоящем документе предусмотрены способы лечения, которые включают измерение аденозин-ассоциированных биомаркеров и выбор субъектов для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

i. Уровни аденозина в плазме

В одном из примеров, пациент или субъект может быть выбран для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на уровнях или экспресси внеклеточного аденозина в образец, таком как плазма. В других примерах, может использоваться уровень внеклеточного аденозина в опухолевом микроокружении конкретной опухоли. Уровни аденозина в плазме могут быть измерены с использованием любых способов, известных в данной области техники, включая способы на основе хроматографии. Специалист в данной области техники способен оценить, количественно измерить, определить и/или обнаружить уровни аденозина в образце плазмы с помощью анализов, известных в данной области техники. Анализы включают *in vitro* или *in vivo* анализы. Примеры анализов, которые могут быть использованы для оценки, определения, количественного измерения и/или иного специфического обнаружения уровней аденозина в образце, включают анализы, основанные на высокоэффективной жидкостной

хроматографии (HPLC) (смотрите, например, Jackson and Ohnishi (1987) Hypertension 10:189-197), спектрофотометрические способы, радиоферментные анализы (смотрите, например, German и Kredich (1984) Anal Biochem. 142(2):536-541), детекция с помощью микроэлектродов и способы визуализации *in vivo*, например, способы на основе биолюминесценции, но не ограничиваясь этим. В некоторых примерах, уровни аденозина в плазме могут быть определены с помощью модифицированного HPLC способа, в основе которого лежит реакция превращения аденозина во флуоресцентное производное, такое как $1,N^6$-этаноаденозин, с целью определения уровней аденозина. (Howard *et al.* (1998) Investigative Opthalmology & Visual Science, 39(10):1942-1946).

ii. Аденозиновые рецепторы (ADR)

Уровень экспрессии аденозиновых рецепторов (ADR) может быть использован в качестве биомаркеров для выбора пациентов или субъектов для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В частности, могут быть использованы ADR, экспрессируемые в опухолевых клетках и/или иммунных клетках, участвующих в иммунитете против опухоли, такие как аденозиновые рецепторы A2A (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 534) и A2B (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 535). Опухоли, которые экспрессируют повышенные или высокие уровни ADR, например, аденозиновых рецепторов A2A и A2B, могут быть более чувствительны к лечению с помощью ADA2, поскольку воздействие на аденозин и рост опухоли может быть опосредовано связыванием аденозина с ADR, экспрессируемыми на опухолевых клетках. Некоторые опухоли характеризуются повышенной экспрессией ADR, в частности, A2A и A2B, и экспрессия этих рецепторов оказывает стимулирующее влияние на развитие рака. В других примерах, сигналинг от аденозина, осуществляемый через стимуляцию рецепторов A2A и A2B, регулирует эндотелиальные воспалительные процессы и ангиогенез опухоли. В других примерах, экспрессия ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, оказывает ингибирующий эффект на активацию и дифференциацию иммунных клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки. Поэтому измерения ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, может быть использовано для лечения

опухолей, в том числе рака, который связан с повышенными уровнями аденозина и/или чувствительного к снижению уровней аденозина или дезоксиаденозина. Уровни ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, могут быть использованы для выбора или идентификации пациентов, которые предположительно будут отвечать на лечение и/или подойдут для мониторинга лечения и эффективности лечения, что обеспечивает улучшенную схему лечения аденозин-ассоциированных заболеваний или состояний, таких как опухоль или рак.

Например, пациент или субъект может быть выбран для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на уровнях или экспрессии аденозиновых рецепторов A2A и A2B в образце, таком как образец опухоли или жидкости от субъекта, имеющего опухоль или предрасположенного к развитию опухоли. Уровень экспрессии ADR, например, аденозиновых рецепторов A2A и A2B, может быть измерен с использованием любых способов, известных в данной области техники для определения уровней внеклеточных рецепторов на клетке. Специалист в данной области техники способен оценить, количественно измерить, определить и/или обнаружить уровни ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, в образце с использованием анализов, известных в данной области техники. Анализы включают *in vitro* или *in vivo* анализы. Примеры анализов, которые могут быть использованы для оценки, определения, количественного измерения и/или иного специфического определения уровней ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, в образце включают твердофазные анализы связывания (*например,* твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), радиоиммунологический анализ (RIA), иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный анализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ, вестерн блоттинг и гистохимические способы, такие как иммуногистохимия (IHC) или псевдоиммунохистохимия с использованием связывающих агентов, не являющихся антителами, но не ограничиваясь этим. В твердофазных анализах связывания, таких как ELISA, например, анализы могут быть проведены в формате сэндвич или в формате конкурентного ингибирования. В других примерах, могут быть использованы способы *in vivo* визуализации.

В настоящем документе предусмотрены способы, направленные на измерение уровней белка ADR, такого как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, в образец, таком как образец опухоли или жидкости от субъекта, имеющего опухоль или предрасположенного к развитию опухоли, с использованием антител против ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B. Примеры антител против аденозинового рецептора A2A включают антитела, полученные из Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; номер по каталогу sc-70321), Abcam (Cambridge, UK; номер по каталогу ab3461) и EMD Milipore (Billerica, MA; номер по каталогу AB1559P). Примеры антител против аденозинового рецептора A2B включают антитела, полученные из Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; номер по каталогу sc-7505), Abcam (Cambridge, UK; номер по каталогу ab40002) и EMD Milipore (Billerica, MA; номер по каталогу AB1589P). Антитела могут быть использованы для обнаружения уровней белка ADR в образцах с использованием таких способов, как иммуногистохимия, ELISA, RIA, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный анализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг. Антитела могут быть модифицированы путем конъюгации, напрямую или не напрямую, с биотином, флуоресцентным фрагментом, радиоактивной меткой или другой обнаруживаемой меткой. В других примерах могут быть использованы вторичные антитела, которые конъюгированы с обнаруживаемой меткой.

Уровни ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, также могут быть определены с использованием способов визуализации *in vivo*. Например, позитронно-эмиссионная томография (PET) с введением производных ксантина, которые обладают антагонистической активностью по отношению к рецептору A2A, радиоактивно меченных излучателем позитронов углеродом-11 (^{11}C), таких как ^{11}C-SCH442416, ^{11}C-KF1783, ^{11}C-KF18446, ^{11}C-KF19631, ^{11}C-CSC, ^{11}C-KW-6002 и ^{11}C-TMSX (Grachev *et al.* (2014) Journal of Diagnostic Imaging in Therapy 1(1):1-19).

Другие способы определения уровней ADR, таких как аденозиновые рецепторы A2A и A2B, включают способы на основе нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR),

микроанализы, количественная PCR, высокопроизводительное транскриптомное секвенирование и другие такие способы.

iii. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73

Уровень экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73, которые экспрессируются на опухолевых клетках, может быть использован в качестве биомаркеров для выбора пациентов или субъектов для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. CD39 и CD73 представляют собой эктонуклеотидазы, которые образуют внеклеточный аденозин из аденозинтрифосфата (ATP). CD39 (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1; EC 3.6.1.5; аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 542) метаболизирует внеклеточный ATP с образованием аденозиндифосфата (ADP) и аденозинмонофосфата (AMP), и CD73 (экто-5'-нуклеотидаза; EC 3.1.3.5; аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 543) метаболизирует AMP с образованием аденозина. CD39 и CD73 являются главными источниками внеклеточного аденозина в условиях, связанных с быстрым повышением уровней аденозина, таких как гипоксия, ишемия, воспаление, опухолевое микроокружение или травма. В этих условиях, внеклеточный ATP накапливается, что приводит к последующему увеличению уровней аденозина за счет работы эктонуклеотидаз CD39 и CD73. При некоторых видах рака, уровни CD39 и CD73 сверхэкспрессированы, и повышенные уровни CD73 связаны с неблагоприятным прогнозом и ранним рецидивом опухолей. Таким образом, уровень экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 может быть использован в качестве биомаркера в случае опухолей, связанных с повышенными уровнями аденозина, и для выбора пациентов для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

Например, пациент или субъект может быть выбран для лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на уровнях или экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в образце, таком как образец опухоли или жидкости от субъекта, имеющего опухоль или предрасположенного к развитию опухоли, или иммунных клеток. Уровень

экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 может быть измерен с использованием любых способов, известных в данной области техники для определения уровней белков плазматической мембраны или внеклеточных белков. Специалист в данной области техники способен оценить, количественно измерить, определить и/или обнаружить уровень экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в образце с использованием анализов, известных в данной области техники. Анализы включают *in vitro* или *in vivo* анализы. Примеры анализов, которые могут быть использованы для оценки, определения, количественного измерения и/или иного специфического определения уровня экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в образце включают твердофазные анализы связывания (*например,* твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), радиоиммунологический анализ (RIA), иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный анализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ, вестерн блоттинг и гистохимические способы, такие как иммуногистохимия (IHC) или псевдоиммунохистохимия с использованием связывающих агентов, не являющихся антителами, но не ограничиваясь этим. В твердофазных анализах связывания, таких как ELISA, например, анализы могут быть проведены в формате сэндвич или в формате конкурентного ингибирования. В других примерах, могут быть использованы способы *in vivo* визуализации.

В настоящем документе предусмотрены способы, направленные на измерение эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в образце, таком как образец ткани или жидкости от субъекта, имеющего опухоль, или подверженного развитию опухоли, с использованием антител против эктонуклеотидаз CD39 и CD73. Примеры антител против CD39 включают антитела, полученные из Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; номер по каталогу sc-65262), Abcam (Cambridge, UK; номер по каталогу ab49580) и EMD Milipore (Billerica, MA; номер по каталогу 04-973). Примеры антител против CD73 включают антитела, полученные из Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; номер по каталогу sc-8502), Abcam (Cambridge, UK; номер по каталогу ab4056) и EMD Milipore (Billerica, MA; номер по каталогу IHCR2023-6). Антитела могут быть использованы для обнаружения уровней белка ADR в образцах с использованием таких способов,

как иммуногистохимия, ELISA, RIA, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный анализ, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ и вестерн-блоттинг. Антитела могут быть модифицированы путем конъюгации, напрямую или не напрямую, с биотином, флуоресцентным фрагментом, радиоактивной меткой или другой обнаруживаемой меткой. В других примерах могут быть использованы вторичные антитела, которые конъюгированы с обнаруживаемой меткой.

Другие способы определения уровней эктонуклеотидаз CD39 и CD73 включают способы на основе нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR), микроанализы, количественная PCR, высокопроизводительное транскриптомное секвенирование и другие такие способы.

b. Выбор пациентов

После определения уровня биомаркеров, таких как уровни аденозина в плазме, уровни ADR, например, A2A или A2B, или уровни эктонуклеотидаз CD39 и CD73, этот уровень можно сравнить контрольным или пороговым уровнем. Контрольный или пороговый уровень обычно представляет собой заранее установленный пороговый уровень или количество, свидетельствующие о заболевании или состоянии, ассоциированном с повышенными уровнями аденозина (*например,* опухоль или рак). Такой уровень или количество могут быть определены эмпирически специалистом в данной области техники. Понятно, что конкретные заранее установленные критерии выбора или классификации для способов в настоящем документе зависят от конкретного анализа, используемого для обнаружения уровня аденозин-ассоциированных биомаркеров, и от конкретного тестируемого образца. Специалист в данной области техники способен определить, подходит ли анализ для тестирования конкретного образца. Анализы на основе *in vitro* твердофазных анализов или высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) могут быть использованы для тестирования образцов биологических жидкостей. Для тестирования образцов тканей могут быть использованы такие анализы, как гистохимия или иммуногистохимия. Также понятно, что в способах, включающих сравнение с заранее установленным уровнем или количеством или

контрольным образцом или образцом сравнения, ссылки даются на один и тот же тип образца и использованием одного и того же анализа и реагентов (включая один и тот же обнаруживаемый фрагмент и способ обнаружения).

Например, заранее установленный пороговый уровень может быть определен, основываясь на уровне или количестве маркера в образце сравнения или контрольном образце, например, может представлять собой медианный или средний уровень или количество маркера в популяции субъектов, с целью оценки различий в уровнях или экспрессии. В одном из примеров, заранее установленный пороговый уровень может представлять собой средний или медианный уровень или количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце, полученном от здорового субъекта или субъекта, у которого имеется состояние или заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями аденозина (*например,* опухоль или рак). В одном из вариантов воплощения, заранее установленный уровень или количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце нормальной ткани или биологической жидкости представляет собой средний уровень или количество, наблюдаемые в нормальных образцах (*например,* во всех проанализированных нормальных образцах). В другом варианте воплощения, уровень или количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце нормальной ткани или биологической жидкости представляет собой медианное значение уровня или количества, наблюдаемого в нормальных образцах. Заранее установленный пороговый уровень также может быть основан на уровне или количестве аденозин-ассоциированного биомаркера в клеточной линии или другом контрольном образце (*например,* опухолевая клеточная линия). Как описано в настоящем документе, эти заранее установленные значения могут быть определены путем сравнения с известными уровнями аденозин-ассоциированного биомаркера в соответствующих нормальных образцах, определенных с помощью того же самого анализа для обнаружения и с использованием тех же самых реагентов для обнаружения, например, с использованием того же самого антитела и способа обнаружения.

Образцом сравнения или контрольным образцом может быть другая ткань, клетка или биологическая жидкость, такая как нормальная ткань, клетка

или биологическая жидкость, например, ткань, клетка или биологическая жидкость, аналогичная тестируемому образцу, но выделенная из другого субъекта. Контрольным субъектом или субъектом сравнения может являться субъект или популяция субъектов, являющихся нормальными (т.е., не имеющими заболевания или состояния), субъект, имеющий заболевание, но у которого отсуствует заболевание или состояние того же типа, которое имеется или предположительно имеется у тестируемого субъекта, например, субъект, у которого отсутствует состояние или заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями аденозина (*например,* опухоль или рак), или аналогичная ткань от другого субъекта, имеющего аналогичное заболевание или состояние, но заболевание которого не столь тяжелое и/или характеризуется более низкой экспрессией аденозин-ассоциированного биомаркера. Например, когда тестируемая клетка, ткань или жидкость получены от субъекта или популяции субъектов, имеющих рак, уровень или количество маркера может сравниваться с уровнем или количеством маркера в ткани, клетке или жидкости, полученных от субъекта, имеющего менее тяжелый рак, например, рак на ранней стадии, дифференцированный рак или другой тип рака. В другом примере контрольный образец или образец сравнения представляет собой жидкость, ткань, экстракт (*например,* клеточный или ядерный экстракт), препарат нуклеиновых кислот или пептидов, клеточную линию, биопсийный образец, стандартный или другой образец, с известным количеством или относительным количеством аденозин-ассоциированного биомаркера, например, образец опухолевой клеточной линии или опухоли, полученный из моделей опухолей, созданных с использованием таких клеточных линий.

В любом способе в настоящем документе, уровень (уровни) аденозин-ассоциированного биомаркера в образцах, полученных от сусбъектов, у которых предположительно имеется или у которых имеется состояние или заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями аденозина (*например,* рак), может быть определен одновременно с определением уровня (уровней) аденозин-ассоциированного биомаркера в контрольных или нормальных тканях. Альтернативно, уровни аденозин-ассоциированного биомаркера в образцах, полученных от сусбъектов, у которых предположительно имеется или у которых

имеется состояние или заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями аденозина (*например*, рак), могут сравниваться с уровнем (уровнями) аденозин-ассоциированного биомаркера, ранее определенным в нормальной ткани или биологической жидкости. Таким образом, уровень аденозин-ассоциированного биомаркера в нормальных или здоровых образцах или в других образцах сравнения, используемых для обнаружения, сравнения, определения или оценки, может представлять собой уровень или количество, определенные до обнаружения, определения или оценки уровня или количества аденозин-ассоциированного биомаркера в образце, полученном от человеческого пациента.

Уровень или количество аденозин-ассоциированного биомаркера определяется и/или оценивается и сравнивается с заранее установленными фенотипами аденозин-ассоциированного биомаркера, ассоциированными с заболеванием. Специалист в данной области техники способен определить пороговый уровень для диагностики заболевания в зависимости от конкретного заболевания, анализа, используемого для обнаружения аденозин-ассоциированного биомаркера и/или используемого реагента для обнаружения. Специалист в данной области техники способен определить пороговый уровень аденозин-ассоциированного биомаркера для классификации ответа на лечение любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Примеры способов стратификации образцов опухолей или образцов биологических жидкостей для диагностики, прогнозирования или выбора субъектов для лечения, предусмотрены в настоящем документе.

Понятно, что конкретное изменение, *например*, увеличение или уменьшение аденозин-ассоциированного биомаркера зависит от используемого анализа. В ELISA кратность увеличения или уменьшения поглощения на определенной длине волны или количества белка (*например*, определенного с помощью стандартной кривой) может быть выражена относительно контроля. В ПЦР-анализе, таком как RT-PCR, уровни экспрессии могут сравниваться с контрольными уровнями экспрессии (*например*, выраженными в виде кратности изменения) с использованием способов, известных специалистам в данной области, например, с помощью стандартов.

В конкретных примерах способов в настоящем документе, субъект выбирается в качестве кандидата для терапии любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, если количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце повышено. Например, повышенные или накопленные уровни аденозин-ассоциированных биомаркеров у субъектов с заболеванием по сравнению со здоровыми или нормальными субъектами свидетельствуют о состоянии или заболевании, ассоциированном с повышенными уровнями аденозина (*например,* опухоль или рак). Аденозин-ассоциированный биомаркер может быть повышен в 0,5 раз, 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз или больше. Таким образом, в примерах способов в настоящем документе, когда тестируется количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце, полученном от субъекта, обнаружение маркера может свидетельствовать о том, что количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце (*например,* раковая клетка, ткань или жидкость), полученном от субъекта, повышено по сравнению с заранее установленным уровнем или количеством или контрольным образцом. В одном из примеров, считается, что у субъекта имеется состояние или заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями аденозина, если количество аденозин-ассоциированного биомаркера в ткани, клетке или жидкости повышено или повышено примерно в 0,5 раз, 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз или больше по сравнению с заранее установленным уровнем или количеством или контрольным образцом.

Субъект может быть выбран в качестве кандидата для терапии любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантами и модифицированными формами, основываясь на уровне или количестве аденозина в образце (*например,* плазмы), полученном от субъекта. Например, уровни аденозина в плазме выше 0,1 мМ, например, 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ, 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ или выше, коррелируют с наличием

опухоли или рака. С использованием таких способов, как приведенные в примерах в настоящем документе, субъект может быть выбран для лечения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, если уровень аденозина в образце жидкости, таком как плазма крови, выше 0,1 мМ, например, 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ, 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ или выше.

Субъект может быть выбран в качестве кандидата для терапии любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на уровне или количестве аденозин-ассоциированного биомаркера, такого как ADR, например, аденозиновые рецепторы A2A (SEQ ID NO: 534) и A2B (SEQ ID NO: 535) или эктонуклеотидазы CD39 (SEQ ID NO: 542) и CD73 (SEQ ID NO: 543), в образце клетки или ткани. В таком примере, если уровень свидетельствует о заболевании, то у пациента диагностируется состояние или заболевание, связанное с повышенными уровнями аденозина. Например, высокий процент окрашивания указывает на то, что у субъекта имеется опухоль с повышенным аденозин-ассоциированным биомаркером, таким как ADR, например, аденозиновые рецепторы A2A и A2B или эктонуклеотидазы CD39 и CD73, что свидетельствует о наличии опухоли, которую можно лечить любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и таким образом, такой пациент является кандидатом для лечения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В других примерах, субъект может быть выбран для лечения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, основываясь на проценте окрашивания, например, если степень окрашивания аденозин-ассоциированного биомаркера составляет 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше от общей площади окрашивания, и, как правило, по меньшей мере, 25% или больше. С использованием гистохимических способов, количество аденозин-ассоциированного биомаркера оценивается количественно и выражается в виде процента положительных пикселей и/или баллов аденозин-ассоциированного биомаркера. Например, количество аденозин-ассоциированного биомаркера, обнаруженное в образце, может быть оценено количественно в виде процента положительных пикселей аденозин-ассоциированного биомаркера. В некоторых

примерах, количество аденозин-ассоциированного биомаркера в образце оценивается количественно как процент окрашенной площади, *например,* процент положительных пикселей аденозин-ассоциированного биомаркера. Например, в образце может быть, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно 0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше положительных пикселей аденозин-ассоциированного биомаркера по сравнению с общей площадью окрашивания.

Эффективность лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, или ответ на лечение также можно контролировать путем сравнения уровня или количества аденозин-ассоциированных биомаркеров у субъекта с течением времени. Изменения уровня или количества аденозин-ассоциированных биомаркеров могут быть использованы для оптимизации дозирования или схемы лечения с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В способе, уровень аденозин-ассоциированных биомаркеров в образцах, полученных от субъектов, подвергаемых лечению, сравнивается с заранее установленным уровнем аденозин-ассоциированных биомаркеров.

Для целей мониторинга лечения, заранее установленный уровень аденозин-ассоциированного биомаркера может представлять собой уровень аденозин-ассоциированного биомаркера у нормального или здорового субъекта, начальное значение аденозин-ассоциированного биомаркера до лечения, предварительно измеренный уровень аденозин-ассоциированного биомаркера у того же самого субъекта на более раннем сроке от начала лечения или классификацию или стратификацию уровней аденозин-ассоциированных биомаркеров, как известно, ассоциированных с прогрессированием или регрессией заболевания. Например, если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера примерно такой же или ниже (или уменьшен) по сравнению с образцом сравнения или контрольным образцом, лечение считается эффективным и лечение может быть продолжено или прекращено или изменено.

Например, заранее установленный уровень аденозин-ассоциированного биомаркера может представлять собой уровень аденозин-ассоциированного биомаркера в образце нормальной или здоровой ткани, и если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера, измеренный у субъекта после лечения выше, чем нормальные уровни аденозин-ассоциированных биомаркеров, то лечение возобновляется или продолжается. Например, заранее установленный уровень аденозин-ассоциированного биомаркера может представлять собой уровень аденозин-ассоциированного биомаркера, определенный в начальной точке до лечения иназначенного курса лечения, соответственно. Например, если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера такой же, как в начальной точке, лечение продолжается или возобновляется; если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера выше, чем в начальной точке, лечение продолжается или возобновляется или лечение ускоряется или увеличивается (*например,* путем увеличения дозировки ADA2 или увеличения частоты дозирования за цикл дозирования); если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера меньше, чем начальные уровни, лечение продолжается или возобновляется, прекращается или снижается или уменьшается (*например,* путем уменьшения дозировки ADA2 или уменьшения частоты дозирования за цикл дозирования). В другом примере заранее установленный уровень аденозин-ассоциированного биомаркера может представлять собой уровень аденозин-ассоциированного биомаркера, определенный в предыдущем измерении на более ранней стадии лечения у того же самого субъекта. Например, если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера такой же, как ранее измеренные уровни, лечение продолжается или возобновляется; если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера выше, чем ранее измеренные уровни, лечение продолжается или возобновляется или лечение ускоряется или увеличивается (*например,* путем увеличения дозировки ADA2 или увеличения частоты дозирования за цикл дозирования); если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера меньше, чем ранее измеренные уровни, лечение продолжается или возобновляется, прекращается или снижается или уменьшается (*например,* путем уменьшения дозировки ADA2 или уменьшения частоты дозирования за цикл дозирования).

В способах мониторинга или способах определения эффективности лечения, конкретная терапия может быть изменена во время курса лечения, чтобы максимизировать индивидуальный ответ. Дозирование и схема лечения могут быть изменены в ответ на изменение уровней. Комбинированная терапия с использованием других терапевтических агентов, таких как другие противораковые агенты, также может быть использована в таких способах лечения. Лечащий врач способен назначить точный курс лечения. Например, лечение может быть изменено таким образом, чтобы скорректировать вводимую дозировку, схему (*например*, частоту введения) или режим, например, прекратить, уменьшить или сделать более частой или вводить совместно с другим лечением для заболевания или состояния. С другой стороны, если уровень аденозин-ассоциированного биомаркера выше, чем в образце сравнения или в контрольном образце, это свидетельствует о том, что пациент не отвечает на лечение. В таких случаях могут быть модифицированы или изменены природа и тип терапевтического агента, такого как ADA2 или комбинированная терапия. В других случаях дозировка, количество, схема и/или режим могут быть скорректированы, например, увеличены или может быть увеличена их частота. Лечащий врач способен назначить точный курс лечения.

Для целей мониторинга эффективности лечения заранее установленные уровни или количества аденозин-ассоциированных биомаркеров могут быть определены эмпирически, при этом уровень или количество указывает на то, что лечение работает. Эти заранее установленные значения могут быть определены путем сравнения с известными уровнями аденозин-ассоциированных биомаркеров в соответствующем нормальном образце или в образцах, полученных от субъектов с заболеванием, которые определены с помощью того же анализа и с использованием того же реагента. Например, высокие уровни аденозин-ассоциированных биомаркеров, которые оцениваются иммуногистохимическими способами с использованием количественной схемы оценки или процента окрашивания опухолей, составляющего более 25% для аденозин-ассоциированных биомаркеров, коррелируют с наличием злокачественных заболеваний по целому ряду типов рака, и свидетельствуют, что пациент не отвечает на лечение.

В способах в настоящем документе, сравнение с заранее установленным уровнем или уровнями уонтрольного образца или образца сравнения может быть осуществлено любым способом, известным специалисту в данной области техники. Например, сравнение уровня аденозин-ассоциированного биомаркера с уровнем сравнения, контрольным уровнем или заранее установленным уровнем может быть осуществлено с помощью автоматизированной системы, такой как программное обеспечение или интеллектуальная система, являющейся частью или совместимой с оборудованием (*например,* компьютерная платформа), на котором проводится анализ. Альтернативно, это сравнение может быть осуществлено врачом или другим обученным или опытным специалистом или техником.

3. Дозировки и способы введения

Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть получена в виде фармацевтической композиции для однократного или многократного введения. Полипептид ADA2 включен в композицию в количестве, достаточном для проявления терапевтического полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов у пациента, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективная концентрация может быть определена эмпирически, путем тестирования полипептидов в известных *in vitro* и *in vivo* системах, например, используя анализы, предусмотренные в настоящем документе или известные в данной области техники (смотрите, *например,* Taliani *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 240: 60-67; Filocamo *et al.* (1997) *J Virology*, 71: 1417-1427; Sudo *et al.* (1996) *Antiviral Res.* 32: 9-18; Bouffard *et al.* (1995) *Virology*, 209:52-59; Bianchi *et al.* (1996) *Anal. Biochem.*, 237: 239-244; Hamatake *et al.* (1996) *Intervirology* 39:249-258; Steinkuhler *et al.* (1998) *Biochem.*, 37:8899-8905; D'Souza *et al.* (1995) *J Gen. Virol.*, 76:1729-1736; Takeshita *et al.* (1997) *Anal. Biochem.*, 247:242-246; смотрите также, *например,* Shimizu *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:8406-8408; Mizutani *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:7219-7223; Mizutani *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:822-826; Lu *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:1412-1417; Hahm *et al.*, (1996) *Virology*, 226:318-326; Ito *et al.* (1996) *J. Gen. Virol.*, 77:1043-1054; Mizutani *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

212:906-911; Cho *et al.* (1997) *J. Virol. Meth.* 65:201-207), и далее экстраполируя их на дозы для людей.

Количество любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, предназначенное для лечения заболевания или состояния, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, анализы *in vitro* и модели на животных могут быть использованы для определения оптимальных диапазонов дозировок. Точная дозировка, которая может быть определена эмпирически, может зависеть от конкретного агента, способа введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и серьезности заболевания. В некоторых вариантах воплощения, вводимые композиции могут содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют вариант полипептида ADA2, предусмотренный в настоящем документе, такие как онколитические вирусные векторы или векторы для генной терапии, или клетки, такие как модифицированные иммунные клетки для адоптивной иммунотерапии. Конкретная дозировка может зависеть от конкретного способа введения, конкретного заболевания или состояния, тяжести заболевания или состояния, конкретной лекарственной формы и других факторов, учитываемых специалистом в данной области техники.

Следовательно, понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения являются функцией заболевания, подлежащего лечению, и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов испытаний или путем экстраполяции данных испытаний *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что значения концентрации и дозы также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования следует корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением лица, осуществляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентраций в настоящем документе приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или применений композиций и комбинаций, содержащих их. Композиции можно вводить каждый час, каждый день, каждую неделю, каждый месяц, каждый год или один раз. Как правило, режимы дозирования выбирают так, чтобы ограничивать токсичность.

Следует отметить, что лечащий врач должен знать, как и когда прекращать, прерывать или корректировать терапию, чтобы снизить дозировку из-за токсичности или нарушений со стороны костного мозга, печени, почек или других тканей. Кроме того, лечащий врач также будет знать, как и когда корректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (исключая токсические побочные эффекты).

Специалист в данной области техники может в клинических условиях определить индивидуальную дозировку ADA2, предусмотренной в настоящем документе, для введения, в зависимости от клинического ответа опухоли и профиля побочных эффектов отдельного субъекта, такого как человек или животное. Например, композиции пегилированной ADA2, предусмотренной в настоящем документе, могут быть получены в дозе 25 Ед/мл. Если мыши весом 25 г инъецировать 0,2 мл этой лекарственной формы, доза составит 200 Ед/кг массы тела. Специалист в данной области техники может определить эквивалентную дозу для человека (HED), основанную на площади поверхности тела, которая составит приблизительно 16 Ед/кг массы тела для человека. Соответствующая HED может быть рассчитана с использованием площади поверхности тела или формулы пересчета, учитывающей массу тела (Reagan-Shaw *et al.* (2008) The FASEB Journal 22(3):659-661).

Диапазон доз любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может составлять от или примерно 10 мЕд/кг массы тела до примерно 50 Ед/кг массы тела или выше. Например, однократная доза может составлять 10 мЕд/кг массы тела, 10 мЕд/кг, 20 мЕд/кг, 30 мЕд/кг, 40 мЕд/кг, 50 мЕд/кг, 60 мЕд/кг, 70 мЕд/кг, 80 мЕд/кг, 90 мЕд/кг, 100 мЕд/кг, 200 мЕд/кг, 300 мЕд/кг, 400 мЕд/кг, 500 мЕд/кг, 600 мЕд/кг, 700 мЕд/кг, 800 мЕд/кг, 900 мЕд/кг, 1 Ед/кг, 2 Ед/кг, 3 Ед/кг, 4 Ед/кг, 5 Ед/кг, 6 Ед/кг, 7 Ед/кг, 8 Ед/кг, 9 Ед/кг, 10 Ед/кг, 20 Ед/кг, 30 Ед/кг, 40 Ед/кг или 50 Ед/кг массы тела. В других примерах, однократная доза может находиться в диапазоне между или примерно между 10 мЕд/кг массы тела и 50 Ед/кг массы тела, 10 мЕд/кг и 40 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 30 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 20 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 10 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 9 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 8 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 7 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 6 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 5 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 4 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 3 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 2 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 1 Ед/кг, 10 мЕд/кг и 900 мЕд/кг, 10

мЕд/кг и 800 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 700 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 600 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 500 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 400 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 300 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 200 мЕд/кг, 10 мЕд/кг и 100 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 50 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 40 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 30 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 20 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 10 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 9 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 8 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 7 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 6 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 5 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 4 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 3 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 2 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 1 Ед/кг, 100 мЕд/кг и 900 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 800 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 700 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 600 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 500 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 400 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 300 мЕд/кг, 100 мЕд/кг и 200 мЕд/кг, 500 мЕд/кг и 50 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 40 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 30 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 20 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 10 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 9 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 8 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 7 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 6 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 5 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 4 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 3 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 2 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 1 Ед/кг, 500 мЕд/кг и 900 мЕд/кг, 500 мЕд/кг и 800 мЕд/кг, 500 мЕд/кг и 700 мЕд/кг, 500 мЕд/кг и 600 мЕд/кг, 1 Ед/кг и 50 Ед/кг, 1 Ед/кг и 40 Ед/кг, 1 Ед/кг и 30 Ед/кг, 1 Ед/кг и 20 Ед/кг, 1 Ед/кг и 10 Ед/кг, 1 Ед/кг и 9 Ед/кг, 1 Ед/кг и 8 Ед/кг, 1 Ед/кг и 7 Ед/кг, 1 Ед/кг и 6 Ед/кг, 1 Ед/кг и 5 Ед/кг, 1 Ед/кг и 4 Ед/кг, 1 Ед/кг и 3 Ед/кг, 1 Ед/кг и 2 Ед/кг, 5 Ед/кг и 50 Ед/кг, 5 Ед/кг и 40 Ед/кг, 5 Ед/кг и 30 Ед/кг, 5 Ед/кг и 20 Ед/кг, 5 Ед/кг и 10 Ед/кг, 5 Ед/кг и 9 Ед/кг, 5 Ед/кг и 8 Ед/кг, 5 Ед/кг и 7 Ед/кг, 5 Ед/кг и 6 Ед/кг, 10 Ед/кг и 50 Ед/кг, 10 Ед/кг и 40 Ед/кг, 10 Ед/кг и 30 Ед/кг, и 10 Ед/кг массы тела и 20 Ед/кг массы тела.

В другом примере, диапазон доз любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может быть между или примерно между 0,1 мг/кг массы тела и 50 мг/кг массы тела, 0,1 мг/кг и 40 мг/кг, 0,1 мг/кг и 30 мг/кг, 0,1 мг/кг и 20 мг/кг, 0,1 мг/кг и 10 мг/кг, 0,1 мг/кг и 9 мг/кг, 0,1 мг/кг и 8 мг/кг, 0,1 мг/кг и 7 мг/кг, 0,1 мг/кг и 6 мг/кг, 0,1 мг/кг и 5 мг/кг, 0,1 мг/кг и 4 мг/кг, 0,1 мг/кг и 3 мг/кг, 0,1 мг/кг и 2 мг/кг, 0,1 мг/кг и 1 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,9 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,8 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,7 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,6 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,5 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,4 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг и 50 мг/кг, 0,5 мг/кг и 40 мг/кг, 0,5 мг/кг и 30 мг/кг, 0,5 мг/кг и 20 мг/кг, 0,5 мг/кг и 10 мг/кг, 0,5 мг/кг и 9 мг/кг, 0,5 мг/кг и 8 мг/кг, 0,5 мг/кг и 7 мг/кг, 0,5 мг/кг и 6 мг/кг, 0,5 мг/кг и 5 мг/кг, 0,5 мг/кг и 4 мг/кг, 0,5 мг/кг и 3 мг/кг, 0,5 мг/кг и 2 мг/кг, 0,5 мг/кг и 1

мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,9 мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,8 мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,7 мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,6 мг/кг, 1 мг/кг и 50 мг/кг, 1 мг/кг и 40 мг/кг, 1 мг/кг и 30 мг/кг, 1 мг/кг и 20 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, 1 мг/кг и 9 мг/кг, 1 мг/кг и 8 мг/кг, 1 мг/кг и 7 мг/кг, 1 мг/кг и 6 мг/кг, 1 мг/кг и 5 мг/кг, 1 мг/кг и 4 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг, 2 мг/кг и 50 мг/кг, 2 мг/кг и 40 мг/кг, 2 мг/кг и 30 мг/кг, 2 мг/кг и 20 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг, 2 мг/кг и 9 мг/кг, 2 мг/кг и 8 мг/кг, 2 мг/кг и 7 мг/кг, 2 мг/кг и 6 мг/кг, 2 мг/кг и 5 мг/кг, 2 мг/кг и 4 мг/кг, 2 мг/кг и 3 мг/кг, 5 мг/кг и 50 мг/кг, 5 мг/кг и 40 мг/кг, 5 мг/кг и 30 мг/кг, 5 мг/кг и 20 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг, 5 мг/кг и 9 мг/кг, 5 мг/кг и 8 мг/кг, 5 мг/кг и 7 мг/кг, 5 мг/кг и 6 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, 10 мг/кг и 40 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, 20 мг/кг и 50 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг, 20 мг/кг и 30 мг/кг, 30 мг/кг и 50 мг/кг, 30 мг/кг и 40 мг/кг, и 40 мг/кг массы тела и 50 мг/кг массы тела. Доза может вводиться однократно или многократно. Соответствующую дозу может определить специалист в данной области техники, основываясь на режиме введения. Суммарная доза за определенный период времени также может быть установлена специалистом в данной области техники.

Оптимальный диапазон доз для введения композиций, содержащих любую ADA2, предусмотренную в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может корректироваться по результатам мониторинга плазмы. Вводимая доза может быть такой, что у субъекта в плазме будет поддерживаться активность ADA в диапазоне от примерно 10 до 1000 мМ/ч, и также будет наблюдаться снижение эритроцитарного аденозина, т.е., концентрация dATP меньше или равна примерно 0,001-0,057 мМ, например, от примерно 0,005 до примерно 0,015 мМ в эритроцитарной массе, или меньше или равна примерно 1% от общей концентрации эритроцитарного аденозина (т.е., содержание ATP+dATP) по сравнению с нормальным уровнем аденозина, измеренным до введения образца. Нормальное значение dATP меньше, чем примерно 0,001 мМ.

Соответственно, способ, предусмотренный в настоящем документе, включает способ лечения опухоли, включающий введение эффективного количества ADA2 субъекту. Эффективное количество для снижения уровней аденозина или дезоксиаденозина в тканях субъекта легко может определить

специалист в данной области техники, а также будут ли рост или распространение опухоли ингибироваться значительным снижением уровней аденозина или дезоксиаденозина в тканях субъекта. Также в настоящем документе предусмотрены способы оценки уровня аденозин-ассоциированных биомаркеров у субъекта с целью отбора субъекта для лечения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Дозы или режим лечения могут меняться или корректироваться в зависимости от восприимчивости пациента к лечению, как определено специалистом в данной области техники с использованием способов, предусмотренных в настоящем документе.

Когда ADA2, предусмотренная в настоящем документе, получена в виде композиции или вводится совместно с другим терапевтическии агентом, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, деградирующий гиалуронан фермент или противоопухолевый агент, дозировки могут быть предусмотрены в виде соотношения количества полипептида ADA2 к количеству другого вводимого терапевтического агента. Например, полипептид ADA2 может быть введен в соотношениях от 1 U ADA:1 U другого терапевтического агента (1:1) до 50:1 или больше, например, в соотношении или примерно в соотношении 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 или больше. В других примерах, полипептид ADA2 может быть введен в соотношении от 1 U ADA:1 U другого терапевтического агента (1:1) до 1:50 или меньше, например, в соотношении или примерно в соотношении 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50 или меньше.

4. Комбинированная терапия

В способах, предусмотренных в настоящем документе, ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть введена до, после или одновременно с применением одной или нескольких других терапевтических схем или введением одного или нескольких других терапевтических агентов. Квалифицированный врач способен определить эмпирически или путем изучения фармакокинетики и способов действия агентов, подходящей дозы или дозы для каждого терапевтического режима или агента, а также

соответствующие сроки и способы введения. Дополнительные терапевтические режимы или агенты могут улучшить эффективность или безопасность ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В некоторых примерах, дополнительные терапевтические режимы или агенты могут быть предназначены для лечения того же самого заболевания или сопутствующего заболевания, не изменяя при этом действие ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В некоторых примерах, дополнительные терапевтические режимы или агенты могут облегчать, снижать или элиминировать один или несколько побочных эффектов, ассоциированных с введением любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе.

Например, ADA2, описанная в настоящем документе, может быть введена в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией или обоими видами терапии. Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть введена в комбинации с одним или несколькими другими профилактическими или терапевтическими агентами, включая антитела, цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, цитокины, ингибирующие рост агенты, антигормональные агенты, ингибиторы киназ, антиангиогенные агенты, кардиопротекторы, иммуностимулирующие агенты, иммуносупрессирующие агенты, ингибиторы иммунных контрольных точек, антибиотики, ингибиторы ангиогенеза или другие терапевтические агенты, но не ограничиваясь этим. Другой терапевтический агент, используемый в комбинации с лечение с помощью ADA2, предусмотреннаяой в настоящем документе, может представлять собой, например, белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярный агент, токсин, липид, углевод или их комбинации или любой другой тип терапевтического агента. В других примерах, дополнительным терапевтическим режимом может быть лучевая терапия.

Один или несколько дополнительных агентов могут быть введены одновременно, после или с перерывом с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Агенты могут вводиться совместно с ADA2, например, как часть одной фармацевтической композиции или одним и тем же способом доставки. В некоторых примерах, агенты могут вводиться совместно с ADA2,

предусмотренной в настоящем документе, в один и тот же момент времени, что и введение ADA2, но другим способом доставки. Агенты также могут быть введены в другой момент времени относительно введения ADA2, но достаточно близко во времени к введению ADA2, чтобы наблюдался комбинированный профилактический или терапевтический эффект. В некоторых примерах один или несколько дополнительных агентов вводятся после или до введения ADA2, предусмотренной в настоящем документе, с учетом выбранного периода времени. В некоторых примерах период времени составляет 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или 3 месяца. В некоторых примерах, один или несколько дополнительных агентов вводятся множество раз и/или ADA2, предусмотренная в настоящем документе, вводится множество раз. В других примерах, варианты ADA2, предусмотренные в настоящем документе, и один или несколько дополнительных агентов представляют собой белки, которые закодированы в одном или нескольких экспрессирующих векторах для *in vivo* экспрессии, в частности, в векторах, направленных против опухолей или в онколитических векторах для экспрессии в опухолевых клетках. В еще одном примере вариант ADA2, предусмотренный в настоящем документе, и один или несколько дополнительных агентов, которые представляют собой белки, могут быть экспрессированы в модифицированных иммунных клетках, а модифицированные иммунные клетки могут вводиться для адаптивной иммунотерапии, которая может напраленно действовать и доставлять ADA2 и дополнительный агент (дополнительные агенты), в частности, к опухолевым клеткам.

a. Противораковые агенты

Способ лечения с использованием ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может сочетаться с введением одного или нескольких противораковых агентов, известных в данной области техники. Комбинированное лечение согласно настоящему изобретению включает введение ADA2 одновременно или последовательно с эффективным количеством противораковых агентов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Противораковый агент может представлять собой, например, химиотерапевтический агент, антитело, пептид

или вектор для генной терапии, вирус или ДНК или их комбинации.

Примеры противораковых агентов для комбинированной терапии включают, например, Taxol™, бевацизумаб (Avastin®), винкристин, винбластин, неомицин, комбретастатин (комбретастатины), подофиллотоксин (подофиллотоксины), TNF-α, ангиостатин, эндостатин, васкулостатин, антагонисты αv-β3, кальциевые ионофоры, агенты, индуцирующие поток кальция, и любые их производные или пролекарства. Противораковые агенты для комбинированной терапии также включают химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, антиангиогенные агенты, индуцирующие апоптоз агенты или противораковые иммунотоксины или коагулиганды, например, Erbitux® (цетуксимаб). Примеры химиотерапевтических агентов включают 5-азацитидин, 5-фторурацил, необязательно в комбинации с лейковорином, 5-фтордезоксиуридин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, митоксантрон, азиридинилбензохинон (AZQ), кармустин (BCNU или BCNU, Bristol-Myers Squibb), блеомицин, карбоплатин (CBDCA), ломустин (CCNU), метил-CCNU или MeCCNU, хлорамбуцил, хлордезоксиаденозин, цисплатин, циклофосфамид, цитарабин, дактиномицин, даунорубицин, дезоксикоформицин, доксорубицин, доксикоформицин, DTIC (дакарбазин), эпирубицин, этопозид (VP-16), флударабин, гексаметилмеламин, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, ифосфамид и месна, левамизол, N-ацетилцистеин (NAC), 1-фенилаланин-иприт, 4'-(9-акридиниламино) метансульфон-м-анизидид (mAMSA), ингибиторы множественной лекарственной устойчивости (т.е., ингибиторы MDR), мелфалан, метотрексат, необязательно в комбинации с лейковорином, митомицин, митомицин-с, ингибиторы белков, связанных с множественной лекарственной устойчивостью ("MRP" ингибиторы), паклитаксел, прокарбазин, стрептозотоцин, N,N'N'-триэтилентиофосфорамид ("тиотепа"), ингибиторы топоизомеразы I и/или топоизомеразы II, таксол, винбластин, винкристин, винкристин, виндезин и тенипозид (VM-26®), но не ограничиваясь этим.

Примеры противораковых агентов, которые могут вводиться после, одновременно с или до введения любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантов и модифицированных форм

включают ацивицин; акларубицин; акодазол; акронин; адозелезин; алдеслейкин; алемтузумаб; алитретиноин (9-цис-ретиноевая кислота); аллопуринол; альтретамин; альвоцидиб; амбазон; амбомицин; аметантрон; амифостин; аминоглутетимид; амсакрин; анастрозол; анаксирон; анцитабин; антрамицин; апазиквон; аргимесна; триоксид мышьяка; аспарагиназу; аспарагиназы; асперлин (Asperlins); атримустин; азацитидин; азетепу; азотомицин; баноксантрон; батабулин; батимастат; живую вакцину БЦЖ; бенаксибин; бендамустин; бензодепа (Benzodepas); бексаротен; бевацизумаб; бикалутамид; биэтасерпин; бирикодар; бисантрен; бисантрен; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицин; бортезомиб; бреквинар; бропиримин; будотитан; бусульфан; кактиномицин; калустерон; канертиниб; капецитабин; карацемид; карбетимир; карбоплатин; карбоквон; кармофур; кармустин с полифепрозаном; кармустин; карубицин; карзелезин; цедефингол; целекоксиб; цемадотин; хлорамбуцил; циотеронел; циплактин; циролемицин; цисплатин; кладрибин; кланфенур; клофарабин; криснатол; циклофосфамид; цитарабин липосомальный; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; дарбэпоэтин альфа; даунорубицин липосомальный; даунорубицин/дауномицин; даунорубицин; децитабин; денилейкин дифтитокс; декснигулдипин; дексона; дексразоксан; дезагуанин; диазиквон; диброспидий; диеногест; диналин; дисермолид; доцетаксел; дофеквидар (Dofequidars); доксифлуридин; доксорубицин липосомальный; доксорубицин HCl; доксорубицин HCl липосомальный для инъекций; доксорубицин; дролоксифен; дромастанолон пропионат; дуазомицин; экомустин; эдатрексат; эдотекарин; эфлорнитин; элакридар; элинафид; раствор Эллиотта B; элсамитруцин; эмитефур; энлоплатин; энпромат; энзастаурин; эпипропидин; эпирубицин; эпоэтин альфа; эпталопрост; эрбулозол; эзорубицин; эстрамустин; этанидазол; этоглуцид; этопозида фосфат; этопозид VP-16; этопозид; этоприн; экземестан; эксисулинд; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; флоксуридин; флударабин; фторурацил; 5-фторурацил; флуоксиместерон; фторцитабин; фосквидон; фостриецин; фостриецин; фотретамин; фулвестрант; галарубицин; галоцитабин; гемцитабин; гемтузумаб/озогамицин; герохинол; гиматекан; гимерацил; глоксазон; глуфосфамид; гозерелина ацетат; гидроксимочевину; ибритумомаб/тиуксетан; идарубицин; ифосфамид; илмофозин; иломастат;

иматиниб мезилат; имексон; импросульфан; индисулам; инпроквон; интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа; интерферон бета; интерферон гамма; интерфероны; интерлейкин-2 и другие интерлейкины (в том числе, рекомбинантные интерлейкины); интоплицин; йобенгуан [131-I]; ипроплатин; иринотекан; ирсогладин; иксабепилон; кетотрексат; L-аланозин; ланреотид; лапатиниб; ледоксантрон; летрозол; лейковорин; лейпролид; лейпрорелин (лейпролид); левамизол; лексакальцитол; лиарозол; лобаплатин; лометрексол; ломустин/CCNU; ломустин; лонафарниб; лозоксантрон; луртотекан; мафосфамид; манносульфан; маримастат; масопрокол; мехлорэтамин; мехлорэтамин/хлорметин; мегестрола ацетат; мегестрол; меленгестрол; мелфалан; мелфалан L-PAM; меногарил, мепитиостан; меркаптопурин; 6-меркаптопурин меркаптопурин; месна; метезинд; метотрексат; метоксален; метомидат; метоприн; метуредепа; мибоплатин; мипроксифен; мизонидазол; митиндомид; митокарцин; митокромин; митофлаксон; митогиллин; митогуазон; митомалцин; митомицин C; митомицины; митонафид; митоквидон; митоспер; митотан; митоксантрон; митозоломид; мивобулин; мизорибин; мофаротен; мопидамол; мубритиниб; микофеноловая кислота; нандролон фенилпропионат; недаплатин; неларабин; неморубицин; нитракрин; нокодазол; нофетумомаб; ногаламицин; нолатрексед; нортопиксантрон; октреотид; опрелвекин; ормаплатин; ортатаксел; отерацил; оксалиплатин; оксисуран; оксофенарсин; паклитаксел; памидронат; патупилон; пегадемаза; пэгаспаргаза; пэгфилграстим; пелдезин; пелиомицин; пелитрексол; пеметрексед; пентамустин; пентостатин; пепломицин; перфосфамид; перифозин; пикоплатин; пинафид; пипоброман; пипосульфан; пирфенидон; пироксантрон; пиксантрон; плевитрексед; пликамицин митрамицин; пликамицин; пломестан; пломестан; порфимер натрия; порфимер; порфиромицин; преднимустин; прокарбазин; пропамидин; проспидий; пумитепа; пуромицин; пиразофурин; хинакрин; ранимустин; расбуриказа; рибоприн; ритросульфан; ритуксимаб; роглетимид; роквинимекс; руфокромомицин; сабарубицин; сафингол; сарграмостим; сатраплатин; себриплатин; семустин; семтразен; сизофиран; собузоксан; сорафениб; спарфозат; спарфозиевая кислота; спарзомицин; спирогерманий; спиромустин;

спироплатин; скваламин; стрептонигрин; стрептоварицин; стрептозоцин; суфосфамид; сулофенур; сунитиниба малат; 6-TG; тацединалин; тальк; тализомицин; таллимустин; тамоксифен; тариквидар; тауромустин; текогалан; тегафур; телоксантрон; темопорфин; темозоломид; тенипозид/VM-26; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиамиприн; тиазофурин; тиломизол; тилорон; тимкодар; тимонацины (Timonacics); тирапазамин; топиксантрон; топотекан; торемифен; тозитумомаб; трабектедин (эктинэсайдин 743); трастузумаб; трестолон; третиноин/ATRA; трицирибин; трилостан; триметрексат; триплатина тетранитрат; трипторелин; трофосфамид; тубулозол; убенимекс; урамустин; уредепа; валрубицин; валсподар; вапреотид; вертепорфин; винбластин; винкристин; виндезин; винепидин; винфлунин; винформид; винглицинат; винлейцинол; винлейросин; винорелбин; винросидин; винтриптол; винзолидин; ворозол; ксантомицин A (гуамециклин); зениплатин; зиласкорб [2-H]; зиностатин; золедронат; зорубицин и зосуквидар; алдеслейкины (*например*, PROLEUKIN®); алемтузумабы (*например*, CAMPATH®); алитретиноины (*например*, PANRETIN®); аллопуринолы (*например*, ZYLOPRIM®); альтретамины (*например*, HEXALEN®); амифостины (*например*, ETHYOL®); анастрозолы (*например*, ARIMIDEX®); триоксиды мышьяка (*например*, ТРИСЕNOX®); аспарагиназыа (*например*, ELSPAR®); живые вакцины БЦЖ (*например*, TICE® BCG); бексаротены (*например,* TARGRETIN®); бевацизумаб (AVASTIN®); блеомицин (*например,* BLENOXANE®); бусульфан для внутривенного введения (*например*, BUSULFEX®); бусульфан для перорального применения (*например*, MYLERAN™); калустероны (*например,* METHOSARB®); капецитабины (*например*, XELODA®); карбоплатины (*например*, PARAPLATIN®); кармустины (*например,* BCNU®, BiCNU®); кармустины с полифепрозанами (*например*, GLIADEL® Wafer); целекоксибы (*например*, CELEBREX®); хлорамбуцилы (*например*, LEUKERAN®); цисплатины (*например*, PLATINOL®); кладрибины (*например*, LEUSTATIN®, 2-CdA®); циклофосфамиды (*например*, CYTOXAN®, NEOSAR®); цитарабины (*например*, CYTOSAR-U®); цитарабин липосомальный (*например,* DepoCyt®); дакарбазины (*например*, DTIC-Domeυ): дактиномицины (*например*,

COSMEGEN®); дарбэпоэтин альфа (*например,* ARANESP®); даунорубицин липосомальный (например, DAUNOXOME®); даунорубицины/дауномицины (*например,* CERUBIDINE®); денилейкин дифтитокс (*например,* ONTAK®); дексразоксаны (*например,* ZINECARD®); доцетакселы (*например,* TAXOTERE®); доксорубицины (*например,* ADRIAMYCIN®, RUBEX®); доксорубицин липосомальный, в том числе, доксорубицин HCl липосомальный для инъекций (*например,* DOXIL®); дромастанолон пропионат (*например,* DROMOSTANOLONE® и MASTERONE® для инъекций); раствор Эллиотта B (*например,* Elliott's B Solution®); эпирубицины (*например,* ELLENCE®); эпоэтин альфа (*например,* EPOGEN®); эстрамустины (*например,* EMCYT®); этопозида фосфат (*например,* ETOPOPHOS®); этопозид VP-16 (*например,* VEPESID®); экземестаны (*например,* AROMASIN®); филграстимы (*например,* NEUPOGEN®); флоксуридины (*например,* FUDR®); флударабины (*например,* FLUDARA®); фторурацилы, в том числе, 5-FU (*например,* ADRUCIL®); фулвестранты (*например,* FASLODEX®); гемцитабины (*например,* GEMZAR®); гемтузумабы/озогамицины (*например,* MYLOTARG®); гозерелина ацетат (*например,* ZOLADEX®); гидроксимочевины (*например,* HYDREA®); ибритумомабы/тиуксетаны (*например,* ZEVALIN®); идарубицины (*например,* IDAMYCIN®); ифосфамиды (*например,* IFEX®); иматиниб мезилат (*например,* GLEEVEC®); интерферон альфа-2a (*например,* ROFERON-A®); интерферон альфа-2b (*например,* INTRON A®); иринотеканы (*например,* CAMPTOSAR®); летрозолы (*например,* FEMARA®); лейковорины (*например,* WELLCOVORIN®, LEUCOVORIN®); левамизолы (*например,* ERGAMISOL®); ломустины/CCNU (*например,* CeeNU®); мехлорэтамины/хлорметины (*например,* MUSTARGEN®); мегестрола ацетат (*например,* MEGACE®); мелфаланы/L-PAM (*например,* ALKERAN®); меркаптопурины, в том числе, 6-MP (*например,* PURINETHOL®); месна (*например,* MESNEX®); метотрексаты; метоксалены (*например,* UVADEX®); митомицины C (*например,* MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); митотаны (*например,* LYSODREN®); митоксантроны (*например,* NOVANTRONE®); нандролон фенилпропионат (*например,* DURABOLIN-50®); нофетумомабы (*например,* VERLUMA®); опрелвекины (*например,* NEUMEGA®); оксалиплатины (*например,* ELOXATIN®); паклитакселы

(*например*, PAXENE®, TAXOL®); памидронаты (*например,* AREDIA®); пегадемасы (*например*, ADAGEN®); пэгаспаргазы (*например*, ONCASPAR®); пэгфилграстимы (*например*, NEULASTA®); пентостатины (*например*, NIPENT®); пипоброманы (*например*, VERCYTE®); пликамицины/митрамицины (*например*, MITHRACIN®); порфимер натрия (*например*, PHOTOFRIN®); прокарбазины (*например*, MATULANE®); хинакрины (*например*, ATABRINE®); расбуриказы (*например*, ELITEK®); ритуксимабы (*например*, RITUXAN®); сарграмостимы (*например*, PROKINE®); стрептозоцины (*например*, ZANOSAR®); сунитиниба малат (*например*, SUTENT®); тальк (*например,* SCLEROSOL®); тамоксифены (*например*, NOLVADEX®); темозоломиды (*например*, TEMODAR®); тенипозиды/VM-26 (*например*, VUMON®); тестолактоны (*например*, TESLAC®); тиогуанины, в том числе, 6-TG; тиотепа (*например*, THIOPLEX®); топотеканы (*например*, HYCAMTIN®); торемифены (*например*, FARESTON®); тозитумомабы (*например*, BEXXAR®); трастузумабы (*например*, HERCEPTIN®); третиноины/ATRA (*например*, VESANOID®); урамустины; валрубицины (*например*, VALSTAR®); винбластины (*например*, VELBAN®); винкристины (*например*, ONCOVIN®); винорелбины (*например*, NAVELBINE®); и золедронаты (*например,* ZOMETA®), но не ограничиваясь этим. Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, может быть использована в комбинированной терапии с другими противораковыми агентами, такими как противораковые агенты, предусмотренные в настоящем документе и/или описанные в Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eds. Hardman and Limbird, Tenth edition (2002).

i. Противораковые антитела

Примеры противораковых антител, которые могут вводиться совместно с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают антитела против антигена клеточной поверхности 17-IA, такие как Panorex® (эдреколомаб); анти-4-1BB антитела; анти-4Dc антитела; анти-A33 антитела, такие как A33 и CDP-833; антитела против α1 интегрина, такие как натализумаб; антитела против α4β7 интегрина, такие как LDP-02; антитела против αVβ1 интегрина, такие как F-200, M-200 и SJ-749; антитела против αVβ3 интегрина,

такие как абциксимаб, CNTO-95, Mab-17E6 и Vitaxin®; антитела против фактора комплемента 5 (C5) антитела, такие как 5G1.1; анти-CA125 антитела, такие как OvaRex® (ореговомаб (oregovomab)); анти-CD3 антитела, такие как Nuvion® (визилизумаб) и Rexomab; анти-CD4 антитела, такие как IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; анти-CD6 антитела, такие как Oncolysin B и Oncolysin CD6; анти-CD7 антитела, такие как HB2; анти-CD19 антитела, такие как B43, MT-103 и Oncolysin B; анти-CD20 антитела, такие как 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.v115, Bexxar®(тозитумомаб), Rituxan® (ритуксимаб) и Zevalin® (ибритутомаб тиуксетан); анти-CD22 антитела, такие как Lymphocide® (эпратузумаб); анти-CD23 антитела, такие как IDEC-152; анти-CD25 антитела, такие как базиликсимаб и Zenapax® (даклизумаб); анти-CD30 антитела, такие как AC10, MDX-060 иSGN-30; анти-CD33 антитела, такие как Mylotarg® (гемтузумаб озогамицин), Oncolysin M и Smart Ml 95; анти-CD38 антитела; анти-CD40 антитела, такие как SGN-40 и торализумаб (toralizumab); анти-CD40L антитела, такие как 5c8, Antova® и IDEC-131; анти-CD44 антитела, такие как биватузумаб (bivatuzumab); анти-CD46 антитела; анти-CD52 антитела, такие как Campath® (алемтузумаб); анти-CD55 антитела, такие как SC-1; анти-CD56 антитела, такие как huN901-DM1; анти-CD64 антитела, такие как MDX-33; анти-CD66e антитела, такие как XR-303; анти-CD74 антитела, такие как IMMU-1 10; анти-CD80 антитела, такие как галиксимаб и IDEC-1 14; анти-CD89 антитела, такие как MDX-214; анти-CD123 антитела; анти-CD138 антитела, такие как B-B4-DM1; анти-CD146 антитела, такие как AA-98; анти-CD148 антитела; анти-CEA антитела, такие как cT84.66, лабетузумаб (labetuzumab) и Pentacea®; анти-CTLA4 антитела, такие как MDX-101; анти-CXCR4 антитела; анти-EGFR антитела, такие как ABX-EGF, Erbitux® (цетуксимаб), IMC-C225 и Merck Mab 425; анти-EpCAM антитела, такие как анти-EpCAM, ING-1 и IS-IL-2 из Crucell; антитела против эфрина B2/EphB4; анти-Her2 антитела, такие как Herceptin®), MDX-210; анти-FAP (белок-активатор фибробластов) антитела, такие как сибротузумаб (sibrotuzumab); антитела против ферритина, такие как NXT-211; анти-FGF-1 антитела; анти-FGF-3 антитела; анти-FGF-8 антитела; анти-FGFR антитела, антитела против фибрина; анти-G250 антитела, такие как WX-G250 и Rencarex®; антитела против ганглиозида GD2 антитела, такие как EMD-273063

и TriGem; антитела против ганглиозида GD3, такие как BEC2, KW-2871 и митумомаб (mitumomab); анти-gpIIb/IIIa антитела, такие как ReoPro; антитела против гепариназы; анти-Her2/ErbB2 антитела, такие как Herceptin® (трастузумаб), MDX-210 и пертузумаб; анти-HLA антитела, такие как Oncolym®, Smart 1D10; анти-HM1.24 антитела; анти-ICAM антитела, такие как ICM3; антитела против IgA рецептора; анти-IGF-1 антитела, такие как CP-751871 и EM-164; анти-IGF-1R антитела, такие как IMC-A12; анти-IL-6 антитела, такие как CNTO-328 и элсилимомаб (elsilimomab); анти-IL-15 антитела, такие как HuMax®-IL15; анти-KDR антитела; антитела против ламинина 5; антитела против антигена Lewis Y, такие как Hu3S193 и IGN-311; анти-MCAM антитела; анти-Muc1 антитела, такие как BravaRex и TriAb; анти-NCAM антитела, такие как ERIC-1 и ICRT; антитела против антигена PEM, такие как Theragyn и Therex; анти-PSA антитела; анти-PSCA антитела, такие как IG8; анти-Ptk антитела; анти-PTN антитела; анти-RANKL антитела, такие как AMG-162; анти-RLIP76 антитела; антитела против антигена SK-1, такие как Monopharm C; анти-STEAP антитела; анти-TAG72 антитела, такие как CC49-SCA и MDX-220; анти-TGF-β антитела, такие как CAT-152; анти-TNF-α антитела, такие как CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (адалимумаб) и Remicade® (инфликсимаб); анти-TRAIL-R1 и TRAIL-R2 антитела; антитела против VE-кадгерин-2 антитела; и анти-VLA-4 антитела, такие как Antegren®, но не ограничиваясь этим. Кроме того, могут быть использованы антиидиотипические антитела, в том числе антитело BEC2 против эпитопа GD3 и антитело 105AD7 против эпитопа gp72, но не ограничиваясь этим. Кроме того, могут быть использованы биспецифические антитела, в том числе анти-CD3/CD20 антитело Bi20, но не ограничиваясь этим.

ii. Химиотерапевтические агенты

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; андрогены, такие как калустерон,

дромостанолонпропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; агенты, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалютамид, лейпролид и госерелин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карубицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин (rodorubicin), стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4 (5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston); антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; азиридины, такие как бензодепа, карбоквон, метуредепа и уредепа; этиленимины и метилмеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, оксида мехлорэтамина гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; белки, такие как аргининдезиминаза и аспарагиназа; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; таксаны, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (TAXOTERE®), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; ингибитор тимидилатсинтазы (такой как Tomudex); дополнительные

химиотерапевтические средства, включая ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефосфамид; демеколцин; диазиквон; дифторметилорнитин (DMFO); эфлорнитин; эллиптиний ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2', 2"-трихлортриэтиламин; уретан, виндезин, дакарбазин, манномустин, митобронит; митолактол, пипоброман, гацитозин, арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан, но не ограничиваясь этим. Также могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого химиотерапевтического агента, приведенного выше.

Химиотерапевтический агент может вводиться в виде пролекарства. Примеры пролекарств, которые могут вводиться с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, включают фосфатсодержащие пролекарства, пролекарства, содержащие тиофосфат, пролекарства, содержащие сульфат, пролекарства, содержащие пептид, пролекарства, модифицированные D-аминокислотой, гликозилированные пролекарства, пролекарства, содержащие бета-лактам, необязательно замещенные феноксиацетамидсодержащие пролекарства или необязательно замещенные фенилацетамид-содержащие пролекарства, 5-фторцитозин и другие 5-фторуридиновые пролекарства, которые могут быть превращены в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство, но не ограничиваясь этим.

iii. Лучевая терапия

Любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может применяться в комбинации с другими терапевтическими режимами. Например, в одном из

вариантов воплощения, пациент, подлежащий лечению с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может подвергаться лучевой терапии. Лучевая терапия может применяться в соответствии с общепринятыми протоколами и известными специалисту в данной области техники. Такая терапия включает облучение цезием, иридием, иодом, кобальтом, облучение рентгеновскими лучами, гамма-лучами, включая как прямое облучение, так и томографическое направленное воздействие, лечение раковых тканей имплантированными радиоактивными частицами, облучение нейтронным пучком тканей, обработанных соединениями бора, и/или другие типы терапии пучками частиц, известные в данной области, но не ограничиваясь этим. Лучевая терапия может представлять собой облучение всего тела или может быть направлена на определенный локальный участок ткани или тела, такой как легкое, мочевой пузырь или предстательная железа. Как правило, лучевая терапия проводится импульсно на протяжении периода времени от примерно 1 до 2 недель. Лучевая терапия, тем не менее, может применяться на протяжении длительных периодов времени. Например, лучевая терапия может применяться к пациентам с раком головы и шеи на протяжении от примерно 6 до примерно 7 недель. Необязательно, лучевая терапия может применяться в виде однократной дозы или в виде нескольких последовательных доз. Специалист в данной области может эмпирически определить подходящую дозу или дозы лучевой терапии, используемые в настоящем документе. В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, и необязательно одно или несколько противораковых средств, используются для обработки раковых клеток *ex vivo*. Подразумевается, что такое лечение *ex vivo* может использоваться при трансплантации костного мозга, в частности, при аутологичной трансплантации костного мозга. Например, лечение клеток или ткани (тканей), содержащих раковые клетки, с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, и одного или нескольких видов противораковых средств, могут быть использованы для удаления или по существу удаления раковых клеток до трансплантации в пациента-реципиента. Лучевая терапия также могут включать лечение изотопно меченной молекулой, такой как антитело. Примеры

радиоиммунотерапевтических средств включают Zevalin® (антитело против CD20, меченное Y-90), LymphoCide® (антитело против CD22, меченное Y-90) и Bexxar® (антитело против CD20, меченное 1-131), но не ограничиваясь этим. Кроме того, подразумевается, что любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, может быть введена пациенту или субъекуту в комбинации также и с другим терапевтическим методом, таким как хирургическое вмешательство или фототерапия.

iv. Антиангиогенные агенты

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими антиангиогенными агентами. Например, антиангиогенный фактор может представлять собой низкомолекулярное соединение или белок (например, антитело, Fc-белок слияния или цитокин), которые связываются с фактором роста или рецептором фактора роста, вовлеченных в ангиогенез. Примеры антиангиогенных агентов включают антитела, которые связываются с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), или которые связываются с VEGF-R, терапевтические агенты на основе РНК, которые снижают уровни экспрессии VEGF или VEGF-R, белки слияния VEGF-токсин, Regeneron's VEGF-trap, ангиостатин (фрагмент плазминогена), антитромбин III, ангиозим, ABT-627, Bay 12-9566, BeneFin, бевацизумаб, бисфосфонаты, BMS-275291, ингибитор из хряща (CDI), CAI, фрагмент комплемента CD59, CEP-7055, Col 3, комбретастатин A-4, эндостатин (фрагмент коллагена XVIII), ингибиторы фарнезилтрансферазы, фрагмент фибронектина, gro-beta, галофугинон, гепариназы, гексасахаридный фрагмент гепарина, HMV833, хорионический гонадотропин человека (hCG), IM-862, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, индуцируемый интерфероном протеин 10 (IP-10), интерлейкин-12, кринги 5 (фрагмент плазминогена), маримастат, ингибиторы металлопротеиназ (например, TIMP), 2-метоксиэстрадиол, MMI 270 (CGS 27023A), ингибитор активатора плазминогена (PAI), тромбоцитарный фактор-4 (PF4), приномастат, 16 кДа фрагмент пролактина, родственный пролиферину белок (PRP), PTK 787/ZK 222594,

ретиноиды, солимастат, скваламин, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, тетрагидрокортизол-S, тетратиомолибдат, талидомид, тромбоспондин-1 (TSP-1), TNP470, трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), васкулостатин, вазостатин (фрагмент калретикулина), тромбоспондин, ZS6126 и ZD6474, но не ограничиваясь этим.

v. Ингибиторы иммунных контрольных точек

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими агентами, которые увеличивают иммунный ответ, блокируя белок иммунных контрольных точек (*т.е.,* ингибитор иммунных контрольных точек). В комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, ингибитор иммунных контрольных точек может представлять собой антитело, направленное против белка иммунных контрольных точек, например, антитело, направленное против антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA4 или CD152), белка программированной клеточной гибели 1 (PD-1) или лиганда 1 белка программированной клеточной гибели 1 (PD-L1).

В частности, комбинированная терапия, предусмотренная в настоящем документе, применима для лечениях всех типов опухолей, в том числе рака, которые ассоциированы с повышенными уровнями аденозина и/или чувствительны к снижению уровней аденозина или дезоксиаденозина у субъекта, подлежащего лечению. В широком смысле, опухоли включают опухоли крови, а также солидные опухоли. Примеры видов рака включают опухоли, которые развиваются в иммунной системе, скелетной системе, мышцах и сердце, груди, желудочно-кишечном тракте, центральной и периферической нервных системах, выделительной системе, репродуктивной системе, дыхательной системе, коже, соединительных тканях, включая суставы, жировых тканях и кровеносной системе, включая стенки кровеносных сосудов, но не ограничиваясь этим.

Терапии для лечения рака включают иммунотерапию (*например,* антагонистами или агонистами ингибирующих белков иммунных контрольных точек), которая приводит к ингибированию иммуносупрессирующего

сигналинга или усилению иммуностимулирующего сигналинга. Вместо прямого направленного действия на опухоль как таковую, в такой терапии используются эндогенные защитные механизмы хозяина для борьбы с опухолью. Например, антагонисты и/или агонисты ингибирующих белков иммунных контрольных точек ко-стимулирующих рецепторов могут стимулировать эндогенный противоопухолевый иммунный ответ хозяина за счет усиления антиген-специфического Т-клеточного ответа. Усиление иммунного ответа хозяина имеет преимущество перед цитотоксической терапией, поскольку эффекты от такого усиления могут быть длительными, так что у субъекта может развиться устойчивый противоопухолевый ответ, который может сохраняться в течение срока от месяцев до нескольких лет после прекращения лечения.

В конкретных примерах, в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, используется агент (*например,* антитело), которое направленно действует на ингибирующий белок иммунных контрольных точек. Примеры целевых ингибирующих белков иммунных контрольных точек и терапевтических антител, направленных против них, приведены в таблице 5.

Таблица 5. Примеры целевых ингибирующих белков иммунных контрольных точек и ингибиторов

Мишень	**Функция мишени**	**Антитело/белок слияния**	**Синонимы и кодовые наименования**
CTLA4	Ингибирующий рецептор	Ипилимумаб Тремелимумаб	(MDX-CTLA4; BMS-734016; MDX-010) (тицилимумаб; CP-675,206)
PD-1	Ингибирующий рецептор	MK-3475 AMP-224 Ниволумаб Пидилизумаб	(пембролизумаб; ламбролизумаб; SCH 900475) (анти-PD-1 белок слияния AMP-224) (BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538) (CT-011)
PD-L1	Лиганд для PD-1	MDX-1105 BMS-936559 MED14736 MPDL33280A	(RG7446)
LAG3	Ингибирующий рецептор	IMP321	ImmuFact
B7-H3	Ингибирующий лиганд	MGA271	

Таблица 5. Примеры целевых ингибирующих белков иммунных контрольных точек и ингибиторов			
Мишень	**Функция мишени**	**Антитело/белок слияния**	**Синонимы и кодовые наименования**
B7-H4	Ингибирующий лиганд		
TIM3	Ингибирующий рецептор		
CD25	Ингибирующая субъединица рецептора		
CD137	Стимулирующий рецептор		
OX40	Стимулирующий рецептор		
4-1BB	Ко-стимулирующий рецептор	Лиганд аптамера	
IDO	Иммуносупрессивный фермент		

В частности, ингибиторы иммунологических ингибирующих молекул CTLA4, PD-1 и PD-L1 подходят для комбинаций и способов, предусмотренных в настоящем документе. Хотя как CTLA4, так и PD-1 функционируют как отрицательные регуляторы, каждый из них играет неопределенную роль в модуляции иммунных ответов: CTLA4 участвует в ослаблении ранней активации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти (покоящихся), тогда как PD-1 играет роль в модуляции Т-клеточной активности в периферических тканях (смотрите, *например,* Keir *et al.* (2008) *Annu Rev Immunol.* 26:677–704; Pardoll, (2012) *Nat Rev Cancer.* 12(4):252–264; Quezada *et al.*, (2013) *Br J Cancer.* 108(8):1560–1565; Callahan *et al.*, (2010) *Semin Oncol.* 37(5):473-84).

Антиген 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами 4 (CTLA4; также называемый CD152; SEQ ID NO: 544) представляет собой ко-ингибирующий рецептор, находящийся в составе везикул, расположенных в цитоплазме наивных или покоящихся Т-клеток. Когда происходит инициация активации Т-клетки, также запускается транспорт этих везикул, содержащих CTLA4, к поверхности Т-клетки. Ингибирующая активность CTLA4 нужна для уменьшения амплитуды стимулирующих сигналов. В этой роли, CTLA4 функционирует для снижения активности Т-клеток и, тем самым, для

ограничения аутоиммунитета. CTLA4 также играет роль в понижающей модуляции активности хелперных Т-клеток и в усилении активности регуляторный Т (T_{reg}) клеток. Ингибирование CTLA4, например, путем введения антител против CTLA4, может привести к усилению иммунного ответа за счет повышения активности CTL, увеличения числа эффекторных и хелперных Т-клеток и/или за счет ингибирования супрессирующей функции T_{reg} клеток. Ингибирование CTLA4 позволяет полностью активировать Т-клетки во время фазы примирования иммунного ответа.

После активации Т-клеток и выхода их в кровоток, индуцируется экспрессия белка программированной клеточной гибели 1 (PD-1; SEQ ID NO: 545), рецептора, который ингибирует активацию Т-клеток. PD-1 также присутствует на регуляторных Т (T_{reg}) клетках, истощенных Т-клетках, активированных В-клетках, естественных киллерах (NK), дендритных клетках (DC) и активированных моноцитах. У PD-1 существует два основных лиганда, PD-1 лиганд 1 (PD-L1; также называемый B7-H1 или CD274; SEQ ID NO: 546) и PD-L2 (также называемый B7-DC или CD273). Воспалительные сигналы в тканях индуцируют экспрессию PD-L1 и PD-L2. После связывания с одним из своих лигандов, PD-1 ослабляет активацию Т-клеток путем ингибирующего сигналинга через Т-клеточный рецептор (TCR), понижающе регулирует секрецию иммуностимулирующих цитокинов и экспрессию белков выживания, и усиливает продукцию Т-клетками иммуносупрессирующего цитокина IL-10. Эти активности предназначены для ограничения коллатерального повреждения тканей и ограничения аутоиммунитета во время иммунного ответа в нормальных условиях. Блокада сигнального пути PD-1, например, путем введения антител против PD-1 или против PD-L1, приводит к восстановлению эффекторных функций Т-клеток, например, эффекторных функций опухоль-специфических Т-клеток, таких как уничтожение опухолевых клеток и секреция иммуностимулирующих цитокинов, таких как интерферон гамма (IFN-γ), интерлейкин-2 (IL-2) и фактор некроза опухолей альфа (TNF-α).

Другие лиганды и рецепторы иммунных контрольных точек участвуют в модуляции иммунного ответа и могут являться мишенями для терапии, направленной на усиление противоопухолевого иммунитета. Кроме того,

блокада двух или более скоординированно экспрессируемых рецепторов или лигандов может привести к возникновению аддитивной или синергичной противоопухолевой активности. Мишени включают ингибирующие лиганды B7, отличные от PD-L1 и PD-L2, такие как B7-H3 и B7-H4, являющиеся повышающе регулированными на опухолевых клетках или клетках, инфильтрующих опухоль. Другие мишени, которые связаны с ингибированием активности лимфоцитов, включают белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG3; также называемый CD223), 2B4 (также называемый CD244), аттенюатор B- и T-лимфоцитов (BTLA; или CD272), мембранный белок T-клеток 3 (TIM3; или HAVcr2), аденозиновый рецептор A2a (A2aR) и семейство рецепторов подавления цитотоксичности. Многие из этих рецепторов иммунных контрольных точек регулируют активность эффекторных T-клеток и T_{reg} клеток. Например, LAG3 высоко экспрессирован на T_{reg} клетках (которые помогают предотвратить развитие аутоиммунитета), где, как считается, он играет важную роль для усиления иммуносупрессирующей активности. LAG3 также связан с ингибированием активности эффекторных T-клеток и может индуцировать анергию T-клеток (Pardoll, (2012) *Nat Rev Cancer*. 12(4):252–264. Антитела против этих белков, по отдельности или в комбинации, способны усиливать противоопухолевый иммунитет в моделях рака на животных. Поскольку многие опухолевые клетки экспрессируют множество ингибирующих лигандов и инфильтрующие опухоль лимфоциты экспрессируют множество ингибирующих рецепторов, эффективным для усиления противоопухолевого иммунитета может стать комбинаторный подход к ингибированию этих белков (смотрите обзор в Pardoll, (2012) *Nat Rev Cancer*. 12(4):252-264). Помимо секретируемых или мембраносвязанных ингибирующих лигандов, метаболические ферменты, такие как индоламин 2,3 диоксигеназа (IDO) и аргиназа, которые экспрессируются ингибирующими клетками-супрессорами миелоидного происхождения обычно инфильтрующими опухоли, могут локально ингибировать иммунный ответ за счет деплеции аминокислот, необходимых для анаболического метаболизма T-клеток. Эти ферменты могут ингибироваться низкомолекулярными лекарственными средствами.

Поскольку ингибиторы иммунных контрольных точек действуют на

иммунные клетки с целью усиления иммунного ответа, усиление ответа при использовании в комбинации с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантами и модифицированными формами, может быть обусловлено увеличением доступа иммунных клеток (*например,* CTL) к опухоли. Например, как описано выше, опухоль и стромальные клетки продуцируют высокий уровень аденозина, что может вызывать иммуносупрессирующие эффекты. За счет снижения аденозин-опосредованной иммуносупрессии, может увеличиться активность циркулирующих иммунных клеток в отношении опухолей, что приведет к увеличению числа цитотоксических и других иммунных клеток, доступных для уничтожения опухолевых клеток. Эффективность противоопухолевых агентов или лекарственных средств, таких как ингибиторы иммунных контрольных точек (*например,* антитело против CTLA4) также может быть увеличена.

Следовательно, применение любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее вариантов и модифицированных форм, например, пегилированной ADA2), может привести к сенсибилизации опухоли к иммуно-опосредованному ответу, которая может быть дополнительно увеличена в присутствии ингибитора иммунных контрольных точек (*например,* антитела против CTLA4 и антитела против PD1 или антитела против PD-L1). Увеличение активности иммунных клеток против опухоли, т.е., уменьшение эффекта аденозин-опосредованной иммуносупрессии, с помощью любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе, может позволить снизить дозировку ингибитора иммунных контрольных точек при сохранении или усилении терапевтической эффективности. Возможность более эффективно подбирать дозировку антитела может приводить к снижению числа неблагоприятных явлений, которые могут быть связаны с терапией антителом. Таким образом, комбинированная терапия, предусмотренная в настоящем документе, может способствовать усилению противоопухолевого иммунного ответа, направленного на ликвидацию опухолей и лечение опухолей.

Комбинированная терапия, в том числе композиции, комбинации и способы и их применения, предусмотренные в настоящем документе, содержит ингибиторы белков иммунных контрольных точек, которые блокируют белок

иммунных контрольных точек, чтобы стимулировать противоопухолевый иммунный ответ. Такие ингибиторы иммунных контрольных точек известны в данной области техники. Примеры таких ингибиторов предусмотрены в настоящем документе, и включают любой ингибирующий агент, мишенью которого является ингибирующий белок иммунных контрольных точек, описанный в таблице 5. Например, ингибитор иммунных контрольных точек или ингибирующий агент представляют собой ингибитор CTLA4, PD-1 и PD-L1. В конкретных примерах, ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело или аптамер. Примеры ингибиторов CTLA4, PD-1 и PD-L1 включают антитела и аптамеры против CTLA4, антитела против PD-1 и антитела против PD-L1.

Ингибитор, который представляет собой аптамер, может быть использован в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе. Аптамер включает олигонуклеотидные (ДНК, РНК или КсНК) или пептидные аптамеры. Аптамер может быть моновалентным или мультивалентным, например, бивалентным или тетравалентным. В некоторых случаях, аптамер может быть модифицирован полимерами, такими как холестерин или полиэтиленгликоль (PEG) для удлинения времени полужизни циркулирующих аптамеров.

В конкретных примерах, ингибиторы иммунных контрольных точек представляют собой антитело, которое блокирует молекулу иммунных контрольных точек (*например,* анти-CTLA4, анти-PD-1 и анти-PD-L1). Антитело может представлять собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с молекулой иммунных контрольных точек (*например,* CTLA4, PD-1 и PD-L1). Другие иммуномодулирующие агенты, предназначенные для применения в комбинациях, способах и применениях, предусмотренных в настоящем документе, включают ингибирующие агенты, мишенью которых являются ингибирующие рецепторы белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG3) и T-клеточный мембранный белок 3 (TIM3), ингибирующие лиганды, такие как PD-L2 (или B7-H2), B7-H3, B7-H4 и CD25, и иммуносупрессирующий фермент индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO). Агенты, направленные против LAG3

(*например,* белок-слияния IMP321 и иногочисленные mAb), и антитела против B7-H3 (*например,* MGA271) были охарактеризованы и используются в клинических испытаниях. Антитела или ингибирующие агенты B7-H4 и TIM3 находятся на стадии доклинических исследований (Pardoll, Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-264). Любой один или несколько этих агентов могут быть включены в любую комбинацию, предусмотренную в настоящем документе. Кроме того, варианты и модифицированные формы антител также могут быть использованы в способе комбинированной терапии, предусмотренном в настоящем документе.

(a) Терапия антителами против CTLA4

Два антитела, которые блокируют CTLA4, ипилимумаб и тремелимумаб, использовались для эффективного лечения некоторых раков, таких как меланома, рак поджелудочнойжелезы, рак яичников, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак (RCC), колоректальный рак (CRC), рак желудочно-кишечного тракта и NSCLC (обзор смотрите в Kyi *et al.*, (2014) *FEBS Letters* 588:368-376). Терапевтическая блокада CTLA4 может влиять на регрессию опухолей effect tumor regression months to years после завершения терапии (Prieto *et al.*, (2012) *Clin Cancer Res.* 18(7):2039-2047; Kirckwood *et al.*, (2010) *Clin Cancer Res.* 16(3):1042-1048), но также может снижать толерантность к другим тканям хозяина, что приводит к нежелательным явлениям, таким как иммуноопосредованные нежелательные явления (irAE).

Комбинированная терапия, предусмотренная в настоящем документе, в том числе композиции и способы и их применения, может включать терапевтические агенты, которые ингибируют CTLA4. Ингибиторы включают антитела и аптамеры. Известны антитела и аптамерные ингибторы, которые связываются с CTLA4 и ингибируют сигналинг CTLA4. Примеры аптамеров, которые связываются с CTLA4, ингибируют функцию CTLA4, и усиливают иммунитет против опухолей, были описаны и приведены в SEQ ID NO:384-388, 539-541 (Santulli-Marotto (2003) *Cancer Res.* 63(21):7483-7489; Gilboa *et al.*, (2013) *Clin Cancer Res* 19(5):1054-1062).

Были описаны несколько антител, которые связываются с CTLA4 и ингибируют активность CTLA4, и которые использовались в

противоопухолевой терапии. Антитела против CTLA4 включают те, которые описаны в патентах США номер 6,682,736, 6,984,720; опубликованных заявках на патенты США номер 2002/0086014; 2009/0074787; EP 1262193; и WO 2000/037504, но не ограничиваясь этим. В частности, антитела против CTLA4 включают ипилимумаб (также называемый MDX-010, MDX-101, 10D1; учетный номер в Drug Bank DB06186) и тремелимумаб (также называемый тицилимумаб, CP-675,206 или 11.2.1) но не ограничиваясь этим.

Например, антитело против CTLA4 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать ипилимумаб (также называемый MDX-010, MDX-101, 10D1; учетный номер в Drug Bank DB06186) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты ипилимумаба. Ипилимумаб представляет собой полноразмерное человеческое IgG1κ моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим CTLA4 (смотрите, *например,* антитело, обозначенное 10D1 в опубликованном патенте США номер 2002/0086014 и патенте США номер 6,984,720). Тяжелая цепь ипилимумаба имеет вариабельный домен (V_H) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:390, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:389. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи включают V_H CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:393); V_H CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:394); и V_H CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:395). Легкая цепь ипилимумаба имеет вариабельный домен (V_L) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:392, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:391. CDR легкой цепи включает V_L CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:396); V_L CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:397); и V_L CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:398). Продуцируемый рекомбинантный способом ипилимумаб состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей длиной 447 аминокислот каждая и двух идентичных каппа легких цепей длиной 215 аминокислот каждая. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

В другом примере, антитело против CTLA4 для применения в

комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать тремелимумаб (также называемый тицилимумаб, CP-675,206 или 11.2.1) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты тремелимумаба. Тремелимумаб представляет собой полноразмерное человеческое IgG2 моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим CTLA4 (смотрите, *например,* антитело, обозначенное 11.2.1 в WO 00/37504). Тяжелая цепь тремелимумаба имеет вариабельный домен (V_H) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:400, кодируемой последовательность нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:399. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи включают V_H CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:471); V_H CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:472); и V_H CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:473). Легкая цепь тремелимумаба имеет вариабельный домен (V_L) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:402, кодируемой последовательность нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:401. CDR легкой цепи включает V_L CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:474); V_L CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:475); и V_L CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:476). Продуцируемый рекомбинантный способом тремелимумаб состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

Эти антитела против CTLA4 участвовали в многочисленных клинических испытаниях для лечения рака. Ипилимумаб одобрен FDA для лечения меланомы и участвовал в клинических испытаниях для лечения других ракой, таких как рак предстательной железы, рак легких и RCC. Тремелимумаб участвовал в клинических испытаниях для лечения CRC, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы и NSCLC.

Антитела против CTLA4 в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, также могут включать варианты ипилимумаба или тремелимумаба, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат вариации, при этом вариант антитела иммуноспецифически связывается с CTLA4. Вариации могут представлять собой, например, аминокислотные

замены, вставки или делеции аминокислот.

(b) Терапия антителами против PD-1 и против PD-L1

Комбинированная терапия, предусмотренная в настоящем документе, в том числе композиции и способы и их применения, включает терапевтические агенты, которые ингибируют PD-1 или PD-L1. Ингибиторы могут включать антитела и белки-слияния, аптамеры. Известны антитела, ингибиторы аптамеры и белки-слияния, которые связываются с PD-1 или PD-L1 и ингибируют ингибирующий сигналинг PD-1. Примеры белков-слияния включают AMP-224 (также известный как B7-DCIg), который представляет собой расвторимый рецептор слияния PD-L2-Fc, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342.

Были описаны несколько антител, которые связываются с PD-1 или PD-L1 и ингибируют ингибирующую активность PD-1, и которые использовались для противоопухолевой иммунотерапии. Антитела против PD-1 включают любые, описанные в патентах США номер 7,943,743, 8,008,449, 8,779,105, 8,735,553; опубликованных заявках на патент США номер 2005/0180969 2007/0166281; международной опубликованной заявке на патент номер WO 2008/156712, но не ограничиваясь этим. Антитела против PD-1 включают любые, описанные в опубликованных заявках на патент США номер 2013/0034559 и 2013/0045202; патентах США номер 7,943,743, 8,217,149, 8,679,767 и 8,779,108; и международных опубликованных заявках на патенты номер WO 2010/077634 и WO 2013/019906, но не ограничиваясь этим.

В частности, антитела против PD-1 включают ниволумаб (также называемое BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 или 5C4), MK-3475 (также называемое пембролизумаб, ламбролизумаб или h409A11), пидилизумаб (также называемое hBAT-1 или CT-011) и AMP-224 (также называемое B7-DCIg). Эти антитела против PD-1 участвовали в многочисленных клинических испытаниях для лечения рака, такого как меланома, NSCLC, RCC, гематологические злокачественные опухоли, лимфома, лейкемия, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак легких и множественная миелома.

Например, антитело против PD-1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать ниволумаб

(также называемое BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 или 5C4) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты ниволумаба. Ниволумаб представляет собой полноразмерное человеческое IgG4 моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1 (смотрите, например, антитело, обозначенное 5C4 в патенте США номер 8,008,449). Тяжелая цепь ниволумаба имеет вариабельный домен (VH) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:404, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:403. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи включают VH CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:407); VH CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:408); и VH CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:409). Легкая цепь ниволумаба имеет вариабельный домен (VL) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:406, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:405. CDR легкой цепи включает VL CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:410); VL CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:411); и VL CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:412). Продуцируемый рекомбинантный способом ниволумаб состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

В другом примере, антитело против PD-1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем, может включать MK-3475 (также называемое пембролизумаб, ламбролизумаб или h409A11) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты MK-3475. MK-3475 представляет собой гуманизированное IgG4κ моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1 (смотрите, например, антитело, обозначенное h409A11 в WO 2008/156712). Полноразмерная тяжелая цепь MK-3475 имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:414, кодируемую последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:413, и полноразмерная легкая цепь имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:416, кодируемую последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:415. Тяжелая цепь состоит из вариабельного домена

(VH), с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:418, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:417). Легкая цепь состоит из вариабельного домена (VL) с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:420, кодируемой последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:419), и гуманизированной константной области каппа легкой цепи. Продуцируемое рекомбинантным способом MK-3475 состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей длиной 447 аминокислот каждая и двух идентичных каппа легких цепей длиной 218 аминокислот каждая. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

CDR антитела MK-3475 включают VH CDR 1 (SEQ ID NO:421); VH CDR 2 (SEQ ID NO:422); VH CDR 3 (SEQ ID NO:423); VL CDR 1 (SEQ ID NO:424); VL CDR 2 (SEQ ID NO:425); и VL CDR 3 (SEQ ID NO:426).

В другом примере, антитело против PD-1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать пидилизумаб (также называемое hBAT-1 или CT-011) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты пидилизумаба. Пидилизумаб представляет собой гуманизированное IgG1 моноклональное антитело, полученное из мышиного антитела (BAT), разработанного против мембран B-лимфоцитов, и которое, как было показано, вызывает активность T-клеток и NK клеток. Пидилизумаб связывается с человеческим PD-1 (смотрите, например, антитело, обозначаемое BAT-1 RкD/RHC в US 2005/0180969). Полноразмерная тяжелая цепь пидилизумаба имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:428, кодируемую последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:427, и полноразмерная легкая цепь имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:430, кодируемую последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:429. Тяжелая цепь состоит из вариабельного домена (VH), с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:432, кодируемого последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:431. Легкая цепь состоит из вариабельного домена (VL,) с аминокислотной

последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:434, кодируемого последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:433, и гуманизированной константной области каппа легкой цепи. Продуцируемый рекомбинантный способом пидилизумаб состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

CDR пидилизумаба включают VH CDR 1 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:435); VH CDR 2 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:436); VH CDR 3 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:437); VL CDR 1 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:438); VL CDR 2 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:439); и VL CDR 3 (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:440).

Антитела против PD-1 в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, также могут включать варианты ниволумаба, MK-3475, пидилизумаба и AMP-224, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат вариации, при этом вариант антитела иммуноспецифически связывается с PD-1. Вариации могут представлять собой, например, аминокислотные замены, вставки или делеции аминокислот.

В частности, антитела против PD-L1 (или антитела против B7H1) включают антитела, называемые BMS-936559 (также известное, как MDX-1105 или 12A4), MPDL3280A (также известное, как RG7446) и MEDI4736, но не ограничиваясь этим. Эти антитела против PD-L1 участвовали в многочисленных клинических испытаниях для лечения рака, такого как меланома, NSCLC, рак яичников, RCC рак легких.

Например, антитело против PD-L1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать BMS-936559 (также называемое MDX-1105 или 12A4) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты BMS-936559. BMS-936559 представляет собой полноразмерное человеческое IgG4 моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-L1 (смотрите,

например, антитело, обозначенное 12A4 в патенте США номер 7,943,743). Тяжелая цепь BMS-936559 имеет вариабельный домен (VH) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:442, кодируемый последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:441. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи включают VH CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:445); VH CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:446); и VH CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:447). Легкая цепь BMS-936559 имеет вариабельный домен (VL) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:444, кодируемый последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:443. CDR легкой цепи включают VL CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:448); VL CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:449); и VL CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:450). Продуцируемое рекомбинантным способом BMS-936559 состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

В другом примере, антитело против PD-L1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать MPDL3280A (также называемое RG7446) или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты MPDL3280A. MPDL3280A представляет собой полноразмерное человеческое IgG4 моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-L1 (смотрите, например, патент США номер 8,217,149 и WO 2013/019906). MPDL3280A содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:463, и вариабельный домен легкой цепи (VL) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:464. Полноразмерное антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO:477 или 479, и последовательность аминокислот легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO:478. Сообщается также, что полноразмерное антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO:461, и последовательность аминокислот легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO:462 (смотрите WO 2013019906). Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи

включают VH CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:465); VH CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:466); и VH CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:467). CDR легкой цепи включают VL CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:468); VL CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:469); и VL CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:470). Продуцируемое рекомбинантным способом MPDL3280A состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

В другом примере, антитело против PD-L1 для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, может включать MEDI4736 или его производные, такие как варианты или антигенсвязывающие фрагменты MEDI4736. MEDI4736 представляет собой полноразмерное человеческое IgG1κ моноклональное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-L1 (смотрите, например, антитело, обозначенное 2.7A4OPT в опубликованной заявке на патент США номер 2013/0034559). Тяжелая цепь MEDI4736 имеет вариабельный домен (VH) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:452, кодируемый последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:451. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи включают VH CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:455); VH CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:456); и VH CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:457). Легкая цепь MEDI4736 имеет вариабельный домен (VL) с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:454, кодируемый последовательностью нуклеотидов, приведенной в SEQ ID NO:453. CDR легкой цепи включают VL CDR 1 (приведена в SEQ ID NO:458); VL CDR 2 (приведена в SEQ ID NO:459); и VL CDR 3 (приведена в SEQ ID NO:460). Продуцируемое рекомбинантным способом MEDI4736 состоит из четырех полипептидных цепей; двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных каппа легких цепей. Каждая пара тяжелой и легкой цепи связана посредством межцепочечной дисульфидной связи.

Антитела против PD-L1 в комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе, также могут включать варианты BMS-936559, MPDL3280A и MEDI4736 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые

содержат вариации, при этом вариант антитела иммуноспецифически связывается с PD-L1. Вариации могут представлять собой, например, аминокислотные замены, вставки или делеции аминокислот.

b. Другие иммуномодулирующие агенты

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими иммуномодулирующими агентами. Такие агенты могут увеличивать или снижать продукцию одного или нескольких цитокинов, повышающе или понижающе регулировать презентацию собственных антигенов, маскировать MHC антигены и способствовать пролиферации, дифференциации, миграции или активации одного или нескольких типов иммунных клеток. Примеры иммуномодулирующих агентов включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), такие как аспирин, ибупрофен, целекоксиб, диклофенак, этодолак, фенопрофен, индометацин, кеторолак, оксапрозин, набуметон, сулиндак, толметин, рофекоксиб, напроксен, кетопрофен и набуметон; стероиды (например, глюкокортикоиды, дексаметазон, кортизон, гидроксикортизон, метилпреднизолон, преднизон, преднизолон, триамцинолон, азульфидин, эйкозаноиды, такие как простагландины, тромбоксаны и лейкотриены; а также топические стероиды, такие как антралин, кальципотриен, клобетазол и тазаротен); цитокины, такие как TGFb, IFNa, IFNb, IFNg, IL-2, IL4, IL-10; цитокин, хемокин или антагонисты рецепторов, в том числе антитела, растворимые рецепторы и белок-слияния рецептор-Fc против BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, факторы комплемента (C5, D) CTLA4, эотаксин, Fas, ICAM, ICOS, IFNα, IFNβ, IFNγ, IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, интегрины, LFA-1, LFA-3, MHC, селектины, TGFβ, TNFα, TNFβ, TNF-R1, T-клеточный рецептор, в том числе Enbrel® (этанерцепт), Humira® (адалимумаб) и Remicade® (инфликсимаб); гетерологичный антилимфоцитарный глобулин; другие иммуномодулирующие молекулы, такие как 2-амино-6-арил-5 замещенные пиримидины, анти-

идиотипические антитела к MHC-связанным пептидам и фрагментам MHC, азатиоприн, бреквинар, бромкриптин, циклофосфамид, циклоспорин A, D-пеницилламин, деоксиспергуалин, FK506, глутаральдегид, золото, гидроксихлорохин, лефлуномид, малононитрилоамиды (например, лефлуномид), метотрексат, миноциклин, мизорибин, микофенолат мофетил, рапамицин и сульфасалазин, но не ограничиваясь этим.

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими цитокинами. Примеры цитокинов включают лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны, но не ограничиваясь этим. Цитокины включают гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метионилированный человеческий гормон роста и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); гепатический фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухолей альфа и бета; мюллерова ингибирующая субстанция; мышиный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-beta; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-alpha и TGF-beta; инсулиноподобный фактор роста-I и-II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон альфа, бета и гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухолей, такой как TNF-alpha или TNF-beta; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и Kit лиганд (KL).

Помимо ингибирующих антител, которые направленно действуют и ингибируют белки иммунных контрольных точек, антитела-агонисты, которые способны стимулировать иммунный ответ путем связывания с их целевым

белком/рецептором, также предусмотрены для применения в комбинациях, способах и применениях в настоящем документе. Например, урелумаб (Urelumab) (также известное как BMS-663513 и анти-4-1BB) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело-агонист, направленно действующее на корецептор CD137, который является представителем семейства рецепторов фактор некроза опухоли (TNF)/фактор роста нервов (NGF) и экспрессируется на дендритных клетках, фолликулярных дендритных клетках, естественных киллерах, гранулоцитах и клетках стенок кровеносных сосудов в очагах воспаления, и обладающее иммуностимулирующими свойствами. Урелумаб (Urelumab) специфично связывается и активирует CD137-экспрессирующие иммунные клетки, стимулируя иммунный ответ, в частности, цитотоксический Т-клеточный ответ против опухолевых клеток, после введения в составе комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе (смотрите, *например,* Vinay *et al.*, (2012) *Mol Cancer Ther*. 11(5):1062-1070). Другие агонисты 4-1BB также могут быть включены в комбинации, предусмотренные в настоящем документе, такие как любые, описанные в Snell *et al.* in Immunol Rev. 244:197–217 (2011). OX40 (также известный как CD134) представляет собой другой иммуностимулирующий рецептор семейства TNF, на который могут направленно действовать агонисты OX40, такие как описанные в Weinberg *et al.* in *Immunol Rev*. 244(1):218-231 (2011), включенные в комбинации, предусмотренные в настоящем документе. Аптамерные лиганды, которые могут связываться с 4-1BB или OX40 и стимулировать сигналинг от них, также были описаны (Gilboa *et al.*, *Clin Cancer Res*. 19(5):1054-1062) и предусмотрены для включения в комбинированную терапию, предусмотренную в настоящем документе.

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими цитокинами или другими агентами, которые стимулируют клетки иммунной системы и усиливают желательные эффекторные функции. Например, агенты, которые стимулируют NK клетки, в том числе IL-2, но не ограничиваясь этим, могут вводиться с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. В другом варианте воплощения,

агенты, которые стимулируют макрофаги, в том числе C5a, формилпептиды, такие как N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (Beigier-Bompadre et. al. (2003) Scand. J. Immunol. 57: 221-8), но не ограничиваясь этим, могут вводиться с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Также, агенты, которые стимулируют нейтрофилы, в том числе G-CSF и GM-CSF, но не ограничиваясь этим, могут вводиться с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Кроме того, агенты, которые способствуют миграции таких иммуностимулирующих цитокинов, могут вводиться с любой ADA2, предусмотренной в настоящем документе. Также дополнительные агенты, в том числе интерферон гамма, IL-3 и IL-7, но не ограничиваясь этим, могут стимулировать одну или несколько эффекторных функций. В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, вводится с одним или несколькими цитокинами или другими агентами, которые ингибируют эффекторные функции клетки.

c. Деградирующий гиалуронан фермент

Комбинированная терапия, в том числе комбинации и способы и их применения, предусмотренные в настоящем документе, может содержать помимо ADA2, предусмотренной в настоящем документе, антигиалуронановый агент, такой как растворимый деградирующий гиалуронан фермент. Деградирующие гиалуронан ферменты представляют собой ферменты, которые катализируют гидролиз гиалуронана и могут временно деградировать гиалуронан. Гиалуронан является компонентом внеклеточного матрикса и основной составляющей интерстициального барьера. Деградирующие гиалуронан ферменты деградируют гиалуронан, расщепляя полимеры гиалуронана, которые состоят из повторяющихся дисахаридных единиц, D-глюкуроновой кислоты (GlcA) и N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc), связанных вместе чередующимися β-1→4 и β-1→3 гликозидными связями. Гиалуронановые цепи могут достигать в длину примерно 25000 дисахаридных повторов или больше, а полимеры гиалуронана могут иметь размер от примерно 5000 до 20000000 Да *in vivo*. Катализируя гидролиз гиалуронана, являющегося основной составляющей интерстициального барьера, деградирующие гиалуронан ферменты снижают вязкость гиалуронана, тем самым повышая

проницаемость тканей. По этой причине деградирующие гиалуронан ферменты, такие как гиалуронидазы, использовались, например, в качестве усиливающих распространение или диспергирующих агентов в сочетании с другими агентами, лекарственными средствами и белками для усиления их дисперсии и доставки.

Некоторые заболевания также связаны с экспрессией и/или продукцией гиалуронана, в том числе воспалительные заболевания и рак. НА связан с различными биологическими процессами, связанными с прогрессированием таких заболеваний (смотрите, например, Itano *et al.* (2008) Semin Cancer Biol 18(4):268-274; Tammi *et al.* (2008) Semin Cancer Biol 18(4):288-295). Например, НА связан с биологическими процессами, ассоциированными с прогрессированием опухоли, включая эпителиально-мезенхимальный переход и путь супрессора опухолей p53. Также, НА участвует в увеличении поглощения воды и внутритканевого давления жидкости (IFP) в пораженных тканях, таких как опухоли, что приводит к сжатию сосудистой сети опухоли. Например, в местах воспаления или в опухолевых очагах происходит быстрое накопление гиалуронана, других компонентов матрикса и воды. Из-за этого быстрого накопления пораженный участок не может прийти к равновесию со своим окружением и, следовательно, внутритканевое давление жидкости в нем выше, чем в нормальных тканях.

Лечение деградирующими гиалуронан ферментами, такими как конъюгированная с полимером растворимая гиалуронидаза (например, PEGPH20), может приводить к деградации НА, накопленного в тканях и клетках, в том числе в опухолевых клетках. Это лечение может снижать количество гиалуронана, в результате чего ткань сдувается, кровеносные сосуды расширяются и больше крови протекает через этот участок. Соответственно, лечение деградирующим гиалуронан ферментом, таким как растворимая гиалуронидаза или конъюгированная с полимером растворимая гиалуронидаза (например, PEGPH20), может привести к уменьшению внутритканевого давления жидкости (IFP) и содержания воды в участке ткани и ассоциированному повышению перфузию сосудов, что обеспечивает лечение заболеваний и состояний, ассоциированных с гиалуронаном, таких как опухоли и рак. Соответственно, деградирующие гиалуронан ферменты для

предусмотренных комбинаций, применений и способов включают любой фермент, способный катализировать расщепление дисахаридной цепи или полимера гиалуронана.

Деградирующие гиалуронан ферменты включают гиалуронидазы, а также другие ферменты, такие как хондроитиназы и лиазы, способные расщеплять гиалуронан. Гиалуронидазы являются представителями большого семейства деградирующих гиалуронан ферментов. Существует три основных класса гиалуронидаз: гиалуронидазы млекопитающих, бактериальные гиалуронидазы и гиалуронидазы из пиявок, других паразитов и ракообразных. Гиалуронидазы млекопитающих (EC 3.2.1.35) представляют собой *эндо-β-N*-ацетил-гексозаминидазы, которые гидролизуют β-1→4 гликозидную связь гиалуронана с образованием олигосахаридов различной длины, таких как тетрасахариды и гексасахариды. Эти ферменты обладают как гидролитической, так и трансгликозидазной активностями, и могут деградировать гиалуронан и хондроитинсульфаты (CS), обычно C4-S и C6-S. В геноме человека было идентифицировано пять гиалуронидазоподобных генов, PH20 (или SPAM1), HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 и HYALP1.

Гиалуронидазы млекопитающих также могут быть далее подразделены на те, которые активны в нейтральной среде, преимущественно обнаруженные в тестикулярных экстрактах, и те, которые активны в кислой среде, преимущественно обнаруженные в органах, таких как печень. HYALP1 является псевдогеном, а для HYAL3 не была показана ферментативная активность в отношении любых известных субстратов. HYAL4 представляет собой хондроитиназу и обладает низкой активностью в отношении гиалуронана. HYAL1 представляет собой прототипный фермент, активный в кислой среде, а PH20 (полипептид-предшественник, приведенный в SEQ ID NO: 551, и зрелый белок, приведенный в SEQ ID NO:480) представляет собой прототипный фермент, активный в нейтральной среде. Активные в кислой среде гиалуронидазы, такие как HYAL1 и HYAL2 обычно не обладают каталитической активностью при нейтральном pH (*m.e.,* pH 7). Например, HYAL1 обладает низкой каталитической активностью *in vitro* при pH 4,5 (Frost *et al.* (1997) *Anal. Biochem.* 251:263-269). HYAL2 представляет собой активный в кислой среде

фермент с очень низкой специфической активностью *in vitro*. Гиалуронидаза-подобные ферменты также могут включать те, которые обычно присоединяются к плазматической мембране посредством гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря, такие как человеческая HYAL2 и человеческая PH20 (Danilkovitch-Miagkova *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8):4580-4585), и те, которые обычно являются растворимыми, такая как человеческая HYAL1 (Frost *et al.* (1997) *Biochem Biophys Res Commun.* 236(1):10-15). Многие гиалуронидазы также являются гликозилированными, и для проявления активности они должны быть гликозилированы. Например, человеческая PH20 содержит шесть N-связанных сайтов гликозилирования в положениях N82, N166, N235, N254, N368, N393 и S490 полипептида, приведенного в SEQ ID NO: 551.

В природе PH20 участвуют в адгезии сперматозоидов и яйцеклеток и способствуют проникновению сперматозоидов в слой клеток яйценосного холмика путем расщепления гиалуроновой кислоты. PH20 находится на поверхности сперматозоида, и в акросоме, образующейся из лизосомы, где она связана с внутренней акросомальной мембраной. мРНК транскрипт человеческой PH20 в норме транслируется с образованием полипептида-предшественника длиной 509 аминокислот (SEQ ID NO: 551), содержащего сигнальную последовательность длиной 35 аминокислот на N-конце (положения аминокислотных остатков 1-35) и сигнальную последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря длиной 19 аминокислот на С-конце (положения аминокислотных остатков 491-509). Следовательно, зрелая PH20 представляет собой полипептид длиной 474 аминокислот, приведенный в SEQ ID NO:480. После транспорта полипептида-предшественника в ER и удаления сигнальной последовательности, С-концевой сигнальный пептид присоединения GPI якоря отщепляется для облегчения ковалентного присоединения GPI якоря к новой С-концевой аминокислоте в аминокислотном положении, соответствующем положению 490 полипептида-предшественника, приведенного в SEQ ID NO: 551. Напротив, явные GPI якоря не предсказаны во многих других PH20, происходящих из других видов, не относящихся к человеку. Таким образом, полипептиды PH20, полученные из овечьих и бычьих источников в природе существуют в растворимых формах.

Несмотря на то, что бычья PH20 очень слабо связана с плазматической мембраной, она не заякорена посредством чувствительного к фосфолипазе якоря (Lalancette *et al.* (2001) *Biol Reprod.* 65(2):628-636). Эта уникальная особенность бычьей гиалуронидазы позволяет использовать фермент растворимую бычью тестикулярную гиалуронидазу в качестве экстракта для клинического применения (Wydase®, Hyalase®).

Следовательно, деградирующие гиалуронан ферменты существуют в мембраносвязанной форме или растворимой форме, которая секретируется из клетки. Деградирующие гиалуронан ферменты могут быть растворимыми, чтобы экспрессироваться и секретироваться из клеток. Например, когда деградирующие гиалуронан ферменты включают гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь и/или иным образом заякорены в мембране или являются не растворимыми, деградирующие гиалуронан ферменты могут быть предусмотрены в растворимой форме за счет укорочения или удаления GPI якорь целиком или части GPI якоря для того, чтобы фермент секретировался и был растворимыми. Растворимые деградирующие гиалуронан ферменты могут быть использованы в способе комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе. Таким образом, деградирующие гиалуронан ферменты включают укороченные варианты, *например,* у которых удален GPI якорь целиком или часть GPI якоря. Примеры таких растворимых гиалуронидаз включают растворимые гиалуронидазы PH20, такие как любые, приведенные в патенте США номер 7,767,429; опубликованных заявках на патент США номер US20040268425, US20100143457 или US20130302275, смотрите также примеры растворимых человеческих гиалуронидаз PH20, приведенных в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532).

Различные формы деградирующих гиалуронан ферментов, в том числе гиалуронидазы, были получены и одобрены для терапевтического применения в субъектах, в том числе в людях. Например, препараты гиалуронидаз животного происхождения включают Vitrase® (ISTA Pharmaceuticals), очищенную овечью тестикулярную гиалуронидазу, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals), бычью тестикулярную гиалуронидазу и Hydase™ (Prima Pharm Inc.), бычью тестикулярную гиалуронидазу. Hylenex® (Halozyme Therapeutics) представляет

собой человеческую рекомбинантную гиалуронидазу, продуцируемую генно-инженерными клетками яичника китайского хомячка (CHO), содержащими нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимые формы PH20, обозначаемые rHuPH20 (смотрите, *например,* опубликованную заявку на патент США номер US20040268425; патент США номер 7,767,429). Понятно, что любой препарат гиалуронидазы может быть использован в способе комбинированной терапии, предусмотренной в настоящем документе (смотрите, *например,* патенты США номер 2,488,564, 2,488,565, 2,676,139, 2,795,529, 2,806,815, 2,808,362, 5,747,027 и 5,827,721 и международную опубликованную PCT заявку номер WO2005/118799; опубликованные заявки на патент США номер US20040268425; патент США номер 7,767,429; или любой предусмотренный в настоящем документе).

В настоящем документе описаны неограничивающие примеры деградирующих гиалуронан ферментов, таких как ферменты гиалуронидазы или фермент растворимая гиалуронидаза, например PH20, для применения в комбинациях и способах, предусмотренных в настоящем документе. Обычно такие деградирующие гиалуронан ферменты включают те, которые конъюгированы с полимером. Деградирующий гиалуронан фермент, такой как гиалуронидаза, может быть, например, человеческого происхождения, из млекопитающих, бактериального происхождения или другого биологического происхождения. В других примерах, деградирующий гиалуронан фермент может быть модифицирован, например, конъюгацией с полимером.

Растворимые деградирующие гиалуронан ферменты (*например,* растворимая PH20)

В частности, предусмотрен свособ комбинированной терапии и композиции, которые включают любой белок ADA2, предусмотренный в настоящем документе, такой как любой вариант белка ADA2, и растворимые деградирующие гиалуронан ферменты, такие как растворимая гиалуронидаза (например, растворимая PH20). Растворимые деградирующие гиалуронан ферменты включают любые деградирующие гиалуронан ферменты, которые секретируются из клеток (например, CHO клетки) после экспрессии и существуют в растворимой форме. Такие ферменты включают растворимые

гиалуронидазы, в том числе не человеческие растворимые гиалуронидазы, включая растворимые гиалуронидазы животных, не относящихся к человеку, бактериальные растворимые гиалуронидазы и человеческие гиалуронидазы, Hyal1, бычью PH20 и овечью PH20, их аллельные варианты и другие их варианты, но не ограничиваясь этим. Например, растворимые деградирующие гиалуронан ферменты включают любые деградирующие гиалуронан ферменты, которые были модифицированы таким образом, что стали растворимыми. Например, деградирующие гиалуронан ферменты, которые содержат GPI якорь могут быть сделаны растворимыми путем укорочения и удаления GPI якоря целиком или части GPI якоря. В одном из примеров, человеческая гиалуронидаза PH20, которая обычно заякорена в мембране посредством GPI якоря, может быть сделана растворимой путем укорочения и удаления GPI якоря целиком или части GPI якоря на С-конце.

Растворимые деградирующие гиалуронан ферменты также включают активные в нейтральной среде и активные в кислой среде гиалуронидазы. В зависимости от факторов, таких как желаемый уровень активности фермента после введения и/или место введения, но не ограничиваясь этим, могут быть выбраны либо активные в нейтральной среде гиалуронидазы, либо активные в кислой среде гиалуронидазы. В конкретном примере, деградирующий гиалуронан фермент представляет собой растворимую гиалуронидазу, активную в нейтральной среде, такуб как растворимый полипептид PH20.

Растворимый полипептид PH20 может представлять собой овечью PH20, бычью PH20 или растворимую PH20, которая укорочена с С-конца и у которой отсутствует вся последовательность присоединения GPI или часть последовательности присоединения GPI. Например, примером растворимой гиалуронидазы является любая PH20 из любого вида организмов или ее укороченные формы, у которых отсутствует С-концевой GPI якорь целиком или часть С-концевого GPI якоря, при условии, что гиалуронидаза является растворимой (секретируется после экспрессии) и сохраняет гиалуронидазную активность. В некоторых случаях, растворимый деградирующий гиалуронан фермент, такой как растворимая PH20, обычно заякорен посредством GPI-якоря (такая как, например, человеческая PH20) и становится растворимым после

укорочения с С-конца. В результате такого укорочения может быть удалена вся сигнальная последовательность присоединения GPI якоря или может быть удалена только часть сигнальной последовательности присоединения GPI якоря. Например, может быть удалено до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 или больше С-концевых аминокислотных остатков. Полученный полипептид, тем не менее, является растворимым. В тех случаях, когда растворимый деградирующий гиалуронан фермент, такой как растворимая PH20, сохраняет часть сигнальной последовательности присоединения GPI якоря, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или больше аминокислотных остатков могут сохраняться в составе сигнальной последовательности присоединения GPI якоря, при условии, что полипептид является растворимым. Специалист в данной области техники способен определить, является ли полипептид заякоренным посредством GPI якоря, используя способы, известные в данной области техники. Такой способ включает использование известных алгоритмов для предсказания наличия и расположения сигнальной последовательности присоединения GPI якоря и ω-сайта, и проведения анализа растворимости до и после обработки фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазой С (PI-PLC) или D (PI-PLD), но не ограничиваясь этим.

Как правило, растворимый деградирующий гиалуронан фермент, такой как растворимая PH20, является человеческим. Несмотря на то, что деградирующие гиалуронан ферменты, такие как PH20, из других животных также могут использоваться, такие препараты являются потенциально иммуногенными, поскольку содержат животные белки. Например, значительная часть пациентов демонстрирует предварительную сенсибилизацию, вторичную по отношению к пищевым продуктам, и поскольку это животные белки, у всех пациентов есть риск последующей сенсибилизации. Таким образом, не человеческие препараты не могут использоваться для длительного применения. Если желательно использование не человеческих препаратов, в настоящем документе предполагается, что такие полипептиды могут быть получены со сниженной иммуногенностью. Специалист в данной области техники способен

определить такие модификации, и они включают, например, удаление и/или замену одного или нескольких антигенных эпитопов на молекуле.

Примером растворимой гиалуронидазы является растворимая человеческая PH20. Растворимые формы рекомбинантной человеческой PH20 были получены и известны. Получение таких растворимых форм PH20 описано в опубликованных заявках на патенты США номер US20040268425; US20050260186, US20060104968, US20100143457 и международной PCT заявке номер WO2009111066. Эти полипептиды включают растворимые полипептиды PH20, у которых полностью отсутствует сигнальная последовательность присоединения GPI якоря или часть сигнальной последовательности присоединения GPI якоря. Например, растворимые полипептиды PH20 (esPH20) могут содержать, по меньшей мере, одну аминокислоту из GPI якоря, или у них могут отсутствовать все аминокислотные остатки GPI якоря. Таким образом, вместо наличия GPI якоря, ковалентно присоединенного к С-концу белка в ER, и присоединения посредством заякоривания к внеклеточному слою плазматической мембраны, эти полипептиды являются секретируемыми и растворимыми. Укороченные с С-конца полипептиды PH20 могут быть укорочены с С-конца на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или больше аминокислот по сравнению с полноразмерным полипептидом дикого типа, таким как полноразмерный полипептид дикого типа с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:480, или его аллельные или межвидовые варианты или другие его варианты.

Растворимые формы человеческой PH20 обычно включают те, которые содержат аминокислоты 36-464, приведенные в SEQ ID NO: 551. Например, растворимые формы включают укороченные с С-конца полипептиды человеческой PH20, приведенной в SEQ ID NO: 551, имеющие С-концевой аминокислотный остаток 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 из последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 551, их зрелые формы, или полипептиды, которые имеют, по меньшей мере, 85% идентичности с ними, но не ограничиваясь этим. Например, при экспрессии в клетках млекопитающих, N-концевая сигнальная

последовательность длиной 35 аминокислот отщепляется в ходе процессинга, в результате чего образуется зрелая форма белка, которая может быть секретирована. Таким образом, зрелые растворимые полипептиды содержат аминокислоты с 36 по 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500 в SEQ ID NO:441. В таблице 6 приведены неограничивающие примеры укороченных с С-конца растворимых полипептидов PH20, включая их полипептиды-предшественники и зрелые формы. В таблице 6 ниже приведены длина (в аминокислотах) полипептидов-предшественников и зрелых полипептидов, и идентификатор последовательности (SEQ ID NO), в котором приведены примеры аминокислотных последовательностей полипептидов-предшественников и зрелых полипептидов для укороченных с С-конца белков PH20. Полипептид PH20 дикого типа также включен в таблицу 6 для сравнения.

Таблица 6. Примеры укороченный с С-конца полипептидов PH20

Белок-предшественник			**Зрелый белок**		
аминокислоты в SEQ ID NO: 551	**длина (aa)**	**SEQ ID NO**	**аминокислоты в SEQ ID NO: 551**	**длина (aa)**	**SEQ ID NO**
1-509	509	551	36-509	474	480
1-500	500		36-500	465	526
1-499	499		36-499	464	493
1-498	498		36-498	463	527
1-497	497		36-497	462	494
1-496	496		36-496	461	528
1-495	495		36-495	460	495
1-494	494		36-494	459	529
1-493	493		36-493	458	496
1-492	492		36-492	457	530
1-491	491		36-491	456	497
1-490	490		36-490	455	499
1-489	489		36-489	454	498
1-488	488		36-488	453	531
1-487	487		36-487	452	500
1-486	486		36-486	451	532
1-485	485		36-485	450	501
1-484	484		36-484	449	502
1-483	483		36-483	448	488
1-482	482		36-482	447	481
1-481	481		36-481	446	482
1-480	480		36-480	445	483
1-479	479		36-479	444	484
1-478	478		36-478	443	485

Таблица 6. Примеры укороченный с С-конца полипептидов PH20					
Белок-предшественник			**Зрелый белок**		
аминокислоты в SEQ ID NO: 551	**длина (aa)**	**SEQ ID NO**	**аминокислоты в SEQ ID NO: 551**	**длина (aa)**	**SEQ ID NO**
1-477	477		36-477	442	486
1-476	476		36-476	441	503
1-475	475		36-475	440	504
1-474	474		36-474	439	505
1-473	473		36-473	438	506
1-472	472		36-472	437	507
1-471	471		36-471	436	508
1-470	470		36-470	435	509
1-469	469		36-469	434	510
1-468	468		36-468	433	511
1-467	467		36-467	432	487
1-466	466		36-466	431	512
1-465	465		36-465	430	513
1-464	464		36-464	429	514

Например, растворимые формы PH20 для применения в комбинация, предусмотренных в настоящем документе, включают, например, полипептид, который имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532, и является растворимым и сохраняет гиалуронидазную активность. Аминокислотные варианты включат консервативные и не консервативные мутации. Понятно, что остатки, важные или необходимые для активности гиалуронидазы, такие как любые описанные выше или известные специалисту в данной области техники, обычно являются инвариантными и не могут быть изменены. Они включают, например, остатки активного сайта. Таким образом, например, аминокислотные остатки 111, 113 и 176 (соответствующие остаткам в зрелом полипептиде PH20, приведенном в SEQ ID NO: 551) человеческого полипептида PH20 или его растворимой формы, обычно являются инвариантыми и не могут быть изменены. Другие остатки, которые отвечают за гликозилирование и образование дисульфидных связей, необходимых для правильного сворачивания белка, также могут быть инвариантными.

В частности, растворимый человеческий полипептид PH20 представляет собой полипепти, укороченный после аминокислоты 482 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 551. Такой полипептид может быть получен из молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей сигнальную последовательность и кодирующую аминокислоты 36-482. Сигнальная последовательность может представлять собой нативную сигнальную последовательность, сигнальную последовательность IgG каппа или другую сигнальную последовательность, которая направляет белок на секрецию. В процессе посттрансляционного процессинга сигнальная последовательность удаляется, в результате чего образуется растворимаяя рекомбинантная человеческая PH20 длиной 474 аминокислоты (SEQ ID NO:480). Продукт, продуцируемый при экспрессии, в результате секретируется в культуральную среду в виде продукта, обозначаемого rHuPH20, который гетерогенен на С-конце, при этом продукт включает смесь вариантов, которые могут представлять собой любой один или несколько из SEQ ID NO:481-486 в различном соотношении. Как правило, rHuPH20 продуцируется в клетках, которые обеспечивают правильное N-гликозилирование для сохранения активности, таких как клетки млекопитающих, например, CHO клетки (например, DG44 CHO клетки). Hylenex® (Halozyme) представляет собой человеческую рекомбинантную гиалуронидазу, продуцируемую генно-инженерными клетками яичника китайского хомячка (CHO), содержащими нуклеиновую кислоту, кодирующую укороченный человеческий полипептид PH20 (обозначенный rHuPH20).

Варианты PH20, такой как человеческая PH20 (*например,* растворимая человеческая PH20) известны и описаны в опубликованной заявке на патент США номер US2013/0302275. Любой вариант PH20, описанный в опубликованной заявке на патент США номер US2013/0302275, может быть включен в растворимый полипептид PH20 для применения в комбинации, предусмотренной в настоящем документе. Такие варианты включают те, которые обладают увеличенной устойчивостью к денатурирующим условиям (*например,* фенольный консервант) или увеличенной активностью. Примером такого полипептида является растворимая человеческая PH20, содержащая аминокислотную замену F204P, V58K или V58R со ссылкой на

последовательность аминокислот полноразмерной человеческой PH20, приведенной в SEQ ID NO:480, или в растворимой человеческой PH20, приведенной в любой из SEQ ID NO:481-488, 493-514 или 526-532.

Обычно растворимые формы PH20 получают с использованием систем экспрессии белков, которые обеспечивают правильное N-гликозилирование для сохранения активности полипептида, поскольку гликозилирование важно для каталитической активности и стабильности гиалуронидаз. Такие клетки включают, например клетки яичника китайского хомячка (CHO) (*например,* DG44 CHO клетки).

Деградирующие гиалуронан ферменты, в том числе гиалуронидазы (*например,* PH20), в комбинациях, предусмотренных в настоящем документе, могут быть получены рекомбинантным способом или могут быть очищены или частично очищены из природных источников, таких как, например, тестикулярные экстракты. Способы получения рекомбинантных белков, включая рекомбинантные деградирующие гиалуронан ферменты, приведены в другом месте в настоящем документе и хорошо известны в данной области.

Деградирующие гиалуронан ферменты могут быть введены в формах, которые увеличивают время полужизни. Например, деградирующий гиалуронан фермент может быть предусмотрен как часть липосомы или многокамерной ламинарной везикулы или другого такого средства доставки (смотрите, *например,* Пример 24 в настоящем документе). Деградирующий гиалуронан фермент может быть закодирован в векторе, таком как онколитический вектор или вектор для направленной доставки.

Деградирующий гиалуронан фермент, такой как растворимая гиалуронидаза (например, растворимый полипептид PH20), предусмотренный в комбинациях в настоящем документе, может быть модифицирован полимером p. В некоторых примерах, полимер представляет собой полиалкиленгликоль, декстран, пуллулан или целлюлозу. Полимеры полиалкиленгликолей, которые могут модифицировать деградирующий гиалуронан фермент, включают полиэтиленгликоль (PEG) и метоксиполиэтиленгликоль (mPEG). В примерах, в которых деградирующий гиалуронан фермент модифицирован PEG, PEG может быть разветвленным или линейным. В некоторых вариантах воплощения,

полимер может быть получен реакцией с метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил бутаноатом (mPEG-SBA) (5 кДа); метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил бутаноатом (mPEG-SBA) (20 кДа); метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил бутаноатом (mPEG-SBA) (30 kDa); метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил α-метилбутаноатом (mPEG-SMB) (20 кДа); метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил α-метилбутаноатом (mPEG-SMB) (30 кДа); метокси-поли(этиленгликоль)-бутиральдегидом (mPEG-бутиральдегид) (30 кДа), метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил пропионатом (mPEG-SPA) (20 кДа); метокси-поли(этиленгликоль)-сукцинимидил пропионатом (mPEG-SPA) (30 кДа); (метокси-поли(этиленгликоль))$_2$-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром (mPEG$_2$-NHS) (10 кДа разветвленный); (метокси-поли(этиленгликоль))$_2$-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром (mPEG$_2$-NHS) (20 кДа разветвленный); (метокси-поли(этиленгликоль))$_2$-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром (mPEG$_2$-NHS) (40 кДа разветвленный); (метокси-поли(этиленгликоль))$_2$-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром (mPEG$_2$-NHS) (60 кДа разветвленный); биотин-поли(этиленгликоль)-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром (биотин-PEG-NHS) (5 кДа биотинилированный); поли(этиленгликоль)-п-нитрофенилкарбонатом (PEG-п-нитрофенилкарбонат) (30 кДа); или поли(этиленгликоль)-пропиональдегид (PEG-пропиональдегид) (30 кДа). В некоторых вариантах воплощения, полимер может представлять собой PEG, который имеет молекулярную массу 30 или примерно 30 килоДальтон.

d. Антитела для лечения инфекционных заболеваний

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими антителами или фрагментами антител для лечения инфекционных заболеваний. Примеры антител, которые могут вводиться совместно для лечения инфекционных заболеваний, включают антитела против сибирской язвы, такие как ABthrax, антитела против CMV, такие как CytoGam и севирумаб (sevirumab), антитела против криптоспоридия, такие как CryptoGAM, Sporidin-G и антихеликобактерные антитела, такие как Pyloran, антитела против гепатита B, такие как HepeX-B, Nabi-HB, антитела

против HIV, такие как HRG-214, антитела против RSV, такие как фелвизумаб (felvizumab), HNK-20, паливизумаб, RespiGam и антитела против стафилококка, такие как Aurexis, Aurograb, BSYX-A110 и SE-Mab, но не ограничиваясь этим.

e. Антибиотики и противогрибковые агенты

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими антибиотиками, включая: аминогликозидные антибиотики (например, арамицин, арбекацин, бамбермицины, бутирозин, дибекацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, паромомицин, рибостамицин, сизомицин, спектиномицин), аминоциклиты (например, спектиномицин), антибиотики амфениколы (например, азидамфеникол, хлорамфеникол, флорфеникол и тиамфеникол), антибиотики ансамицины (например, рифамид и рифампин), карбапенемы (например, имипенем, меропенем, панипенем); цефалоспорины (например, цефаклор, цефадроксил, цефамандол, цефатризин, цефаседон, цефозопран, цефпимизол, цефпирамид, цефпиром, цефпрозил, цефуроксим, цефиксим, цефалексин, цефрадин), цефамицины (цефбуперазон, цефокситин, цефминокс, цефметазол и цефотетан); линкозамиды (например, клиндамицин, линкомицин); макролид (например, азитромицин, брефелдин А, кларитромицин, эритромицин, рокситромицин, тобрамицин), монобактамы (например, азтреонам, карумонам и тигемонам); мупироцин; оксацефемы (например, фломоксеф, латамоксеф и моксалактам); пенициллины (например, амдиноциллин, амдиноциллин пивоксил, амоксициллин, бакампициллин, бензилпенициллиновая кислота, бензилпенициллин натрий, эпициллин, фенбенициллин, флоксациллин, пенамециллин, пенетамата гидройодид, пенициллин о-бенетамин, пенициллин О, пенициллин V, пенициллин V бензоат, пенициллин V гидрабамин, пенимепициклин и фенетициллин калия); полипептиды (например, бацитрацин, колистин, полимиксин В, тейкопланин, ванкомицин); хинолоны (амифлоксацин (amifloxacin), циноксацин, ципрофлоксацин, эноксацин, энрофлоксацин, флероксацин, флумекин, гатифлоксацин, гемифлоксацин, грепафлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, налидиксовая кислота, норфлоксацин, офлоксацин, оксолиновая кислота, пефлоксацин, пипемидовая кислота,

розоксацин (rosoxacin), руфлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, тосуфлоксацин и тровафлоксацин); рифампицин; стрептограмины (например, хинупристин, дальфопристин); сульфонамиды (сульфаниламид, сульфаметоксазол); тетрациклины (хлортетрациклин, демеклоциклина гидрохлорид, деметилхлортетрациклин, доксициклин, дурамицин, миноциклин, неомицин, окситетрациклин, стрептомицин, тетрациклин и ванкомицин), но не ограничиваясь этим.

В некоторых примерах, любая ADA2, предусмотренная в настоящем документе, в том числе дикого типа, ее варианты и модифицированные формы, вводится с одним или несколькими противогрибковыми агентами, включая амфотерицин B, циклопирокс, клотримазол, эконазол, флуконазол, флуцитозин, итраконазол, кетоконазол, миконазол, нистатин, тербинафин, терконазол и тиоконазол, но не ограничиваясь этим. В некоторых примерах ADA2, предусмотренная в настоящем документе, вводится с одним или несколькими противовирусными агентами, включая ингибиторы протеаз, ингибиторы обратной транскриптазы и другие, включая интерфероны I типа, ингибиторы вирусного слияния, ингибиторы нейраминидазы, ацикловир, адефовир, амантадин, ампренавир, клевудин, энфувиртид, энтекавир, фоскарнет, ганцикловир, идоксуридин, индинавир, лопинавир, плеконарил, рибавирин, римантадин, ритонавир, саквинавир, трифлюридин, видарабин и зидовудин, но не ограничиваясь этим.

I. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕР 1

КЛОНИРОВАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ 2 (ADA2) И СОЗДАНИЕ ВАРИАНТОВ ADA2

A. Клонирование ADA2 дикого типа (WT)

Ген человеческой аденозиндезаминазы дикого типа (ADA2), включая его сигнальную последовательность (последовательность нуклеиновой кислоты, приведенная в SEQ ID NO: 1; кодирующая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2 (предшественник)),

амплифицировали и клонировали между сайтами рестрикции ScaI и XhoI вектора pCMV-Script (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; номер по каталогу 212220; последовательность приведена в SEQ ID NO:6). На С-конце кодирующей последовательности стоп-кодон заменили на нуклеотидную последовательность, кодирующую метку FLAG™ (нуклеотидная последовательность приведена в SEQ ID NO:8; аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:9), и стоп-кодон, с целью очистки и/или обнаружения белка. Полученная конструкция pCMV-Script-hADA2-FLAG кодирует рекомбинантный человеческий полипептид ADA2-FLAG дикого типа (аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO:7).

B. Создание вариантов ADA2

Эту полученную конструкцию, кодирующую rHuADA2 WT, описанную выше, использовали для введения сайт-специфических аминокислотных замен и создания вариантов ADA2. Как описано в подразделах ниже, сайт-специфические аминокислотные замены были созданы на основе моделирования ADA2 для идентификации остатков, которые участвуют в связывании с гепарином, каталитической активности и/или ослаблении белок-белковых взаимодействий между ADA2 и любыми рецепторами, с которыми связывается ADA2. Каждый созданный вариант ADA2 получали из вектора pCMV-Script-hADA2-FLAG, описанного выше, со сайт-специфическими заменами, используя набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; номер по каталогу 210514) в соответствии с инструкциями производителя.

Созданные варианты приведены в таблицах 7-12 ниже. Варианты обозначены согласно нумерации по Zavialov, адаптированной из нумерации, используемой в последовательности под учетным номером 3LGG и 3LGD в PDB (аминокислотная последовательность полипептида, используемая для кристаллической структуры, приведена в SEQ ID NO: 4; на основе Zavialov *et al.*, J. Biol. Chem. 285:12367-12377 (2010)), и согласно нумерации зрелой ADA2 на основе аминокислотной последовательности зрелой человеческой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5 (на основе последовательности под учетным номером Q9NZK5 в Uniprot; аминокислотная последовательность

предшественника, содержащая аминокислотные остатки 1-29 сигнальной последовательности, приведена в SEQ ID NO: 2). В таблице 1 приведены соответствующие номера положений согласно нумерации по Zavialov (SEQ ID NO:4) и нумерации зрелой формы ADA2 (SEQ ID NO: 5).

a. Варианты-кандидаты с измененным связыванием гепарина

Гепарин представляет собой встречающийся в природе гликозаминогликан, широко распространенный в организме и присутствующий на поверхности тканей. Известно, что ADA2 физически взаимодействует с гепарином (Zavialov *et al.,* J. Biol. Chem. 285:12367-12377 (2010)), и связывание с гепарином может привести к уменьшению циркулирующих уровней введенного ADA2. Для создания вариантов ADA2 с улучшенной фармакокинетикой осуществили замену остатков, идентифицированных как участвующие в связывании с гепарином на основе моделирования. Для идентификации возможных положений для мутагенеза использовали две доступные кристаллические структуры человеческой ADA2, описанной в Zavialov *et al.,* J. Biol. Chem. 285:12367-12377 (2010): кристаллическая структура ADA2, для которой не показано связывание с гепарином и которая экспрессируется из клеток дрозофилы (RCSB Protein Data Bank (PDB), учетный номер 3LGG; человеческая ADA2, связанная с аналогом переходного состояния коформицином); и человеческая ADA2 в апо-форме (учетный номер в Protein Data Bank 3LGD; фермент, не связанный с кофакторами или субстратами). На основе кристаллических структур, используя общедоступный пакет для 3D молекулярной визуализации PyMOL, рассчитывали электростатический потенциал поверхности с целью идентификации поверхностей на ADA2, которые имеют положительный электростатический потенциал. Поверхности с положительным электростатическим потенциалом могут вступать в комплементарные электростатические взаимодействия с сильно отрицательно заряженным гепарин сульфатом. В соответствии с расчетами электростатического потенциала поверхности ряд остатков лизина и аргинина идентифицировали в качестве сайтов для замен на аминокислоты аланин (для замены положительно заряженной боковой цепи лизина или аргинина на метиленовую группу, не оказывая при этом влияния на углы фи-пси в белке),

аспартат или глутамат (две известные отрицательно заряженные аминокислоты), для создания отталкивания зарядов между гепарином и вариантом ADA2.

На основе моделирования были выбраны аминокислотные остатки 14, 16, 23, 29, 220, 261, 280, 286, 312, 320, 324, 369, 374, 375, 444, 447, 455, 464, 472 или 473 согласно нумерации по Zavialov (соответствующие остаткам 11, 13, 20, 26, 217, 258, 277, 283, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 441, 444, 452, 461, 469 или 470, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) для мутагенеза. Варианты ADA2 были созданы путем аминокислотной замены аминокислоты в положении на аланин, аспартат или глутамат. Также были сделаны одноаминокислотные замены, а также двойные и тройные аминокислотные замены. В таблице 7 приведены аминокислотные замены в примерах вариантов-кандидатов. Пример 7 описывает оценку связывания с гепарином и активности аденозиндезаминазы выбранных вариантов-кандидатов, приведенных в таблице 7.

Таблица 7. Варианты-кандидаты ADA2 для ослабления связывания с гепарином (HBP)

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой ADA2)	SEQ ID NO:
K14A	K11A	13
K14D	K11D	14
K14E	K11E	15
K16A	K13A	16
K16D	K13D	17
K16E	K13E	18
R23A	R20A	28
R23D	R20D	29
R23E	R20E	30
K29A	K26A	71
K29D	K26D	72
K29E	K26E	73
R220A	R217A	74
R220D	R217D	75
R220E	R217E	76
K261A	K258A	77
K261D	K258D	78
K261E	K258E	79
R280A	R277A	80
R280D	R277D	81
R280E	R277E	82

Таблица 7. Варианты-кандидаты ADA2 для ослабления связывания с гепарином (HBP)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой ADA2)	SEQ ID NO:
R286A	R283A	83
R286D	R283D	84
R286E	R283E	85
K312A	K309A	86
K312D	K309D	87
K312E	K309E	88
K320A	K317A	89
K320D	K317D	90
K320E	K317E	91
K324A	K321A	92
K324D	K321D	93
K324E	K321E	94
R355A	R352A	95
R355D	R352D	96
R355E	R352E	97
R369A	R366A	31
R369D	R366D	32
R369E	R366E	33
K374A	K371A	19
K374D	K371D	20
K374E	K371E	21
K375A	K372A	22
K375D	K372D	23
K375E	K372E	24
R444A	R441A	98
R444D	R441D	99
R444E	R441E	100
K447A	K444A	101
K447D	K444D	102
K447E	K444E	103
K455A	K452A	25
K455D	K452D	26
K455E	K452E	27
K464A	K461A	104
K464D	K461D	105
K464E	K461E	106
K472A	K469A	107
K472D	K469D	108
K472E	K469E	109
K473A	K470A	110

Таблица 7. Варианты-кандидаты ADA2 для ослабления связывания с гепарином (HBP)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой ADA2)	SEQ ID NO:
K473D	K470D	111
K473E	K470E	112
K14A/R23A	K11A/R20A	55
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	56
R23A/K374A	R20A/K371A	57
K14A/K374A	K11A/K371A	58

b. Варианты кандидаты активного сайта (AS)

Для создания вариантов ADA2 с улучшенной каталитической эффективностью варианты-кандидаты были созданы путем замены аминокислотных остатков в активном сайте, идентифицированных на основе молекулярного моделирования. Кристаллические структуры человеческой ADA2, связанной с аналогом переходного состояния коформицином (учетный номер в Protein Data Bank 3LGG), и в апо-форме (учетный номер в Protein Data Bank 3LGD), как описано выше, визуализировали, используя общедоступную программу для 3D молекулярного моделирования PyMol. *In silico* сайт-направленный мутагенез проводили с помощью PyMol для оценки упаковки введенных боковых цепей аминокислот с аденозином или соседними остатками в активном сайте, оценки упаковки соседних остатков около активного сайта или в углублении кармана в активном сайте, измерения расстояния и потенциала для стерических столкновений введенных остатков, оценки изменений в относительной вогнутости кармана активного сайта и оценки потенциала доступа аденозина в активный сайт. Остатки, выбранные для мутагенеза, соответствовали остаткам, идентифицированным в настоящем документе как кандидаты для улучшения каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина, и поэтому были связаны с увеличенной активностью аденозиндезаминазы.

На основе моделирования аминокислотные остатки 89, 182, 222, 224, 265, 267, 269, 270 и 299 согласно нумерации по Zavialov (соответствующие остаткам 86, 179, 219, 221, 262, 264, 266, 267 или 296 согласно нумерации зрелой формы) были выбраны для мутагенеза. Варианты ADA2 были созданы путем аминокислотной замены аминокислоты в этом положении на каждую из

девятнадцати других аминокислот. В таблице 8 приведены аминокислотные замены примеров вариантов-кандидатов. Пример 10 описывает исследования по оценке активности аденозиндезаминазы выбранных вариантов-кандидатов.

Таблица 8. Варианты-кандидаты активного сайта rHuADA2 (AS)

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
D89A	D86A	113
D89C	D86C	114
D89E	D86E	115
D89F	D86F	116
D89G	D86G	117
D89H	D86H	118
D89I	D86I	119
D89K	D86K	120
D89L	D86L	121
D89M	D86M	122
D89N	D86N	123
D89P	D86P	124
D89Q	D86Q	125
D89R	D86R	126
D89S	D86S	127
D89T	D86T	128
D89V	D86V	129
D89W	D86W	130
D89Y	D86Y	131
E182A	E179A	46
E182C	E179C	132
E182D	E179D	45
E182F	E179F	133
E182G	E179G	50
E182H	E179H	134
E182I	E179I	135
E182K	E179K	136
E182L	E179L	137
E182M	E179M	138
E182N	E179N	139
E182P	E179P	140
E182Q	E179Q	141
E182R	E179R	142
E182S	E179S	47
E182T	E179T	48
E182V	E179V	49
E182W	E179W	143

Таблица 8. Варианты-кандидаты активного сайта rHuADA2 (AS)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
E182Y	E179Y	144
R222A	R219A	41
R222C	R219C	145
R222D	R219D	146
R222E	R219E	147
R222F	R219F	148
R222G	R219G	149
R222H	R219H	150
R222I	R219I	151
R222K	R219K	38
R222L	R219L	152
R222M	R219M	153
R222N	R219N	40
R222P	R219P	154
R222Q	R219Q	39
R222S	R219S	155
R222T	R219T	156
R222V	R219V	157
R222W	R219W	158
R222Y	R219Y	159
L224A	L221A	42
L224C	L221C	160
L224D	L221D	161
L224E	L221E	162
L224F	L221F	163
L224G	L221G	44
L224H	L221H	164
L224I	L221I	165
L224K	L221K	166
L224M	L221M	167
L224N	L221N	168
L224P	L221P	169
L224Q	L221Q	170
L224R	L221R	171
L224S	L221S	172
L224T	L221T	173
L224V	L221V	43
L224W	L221W	174
L224Y	L221Y	175
S265A	S262A	51
S265C	S262C	176

Таблица 8. Варианты-кандидаты активного сайта rHuADA2 (AS)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
S265D	S262D	177
S265E	S262E	178
S265F	S262F	179
S265G	S262G	180
S265H	S262H	181
S265I	S262I	182
S265K	S262K	183
S265L	S262L	184
S265M	S262M	53
S265N	S262N	54
S265P	S262P	185
S265Q	S262Q	186
S265R	S262R	187
S265T	S262T	188
S265V	S262V	52
S265W	S262W	189
S265Y	S262Y	190
H267A	H264A	34
H267C	H264C	191
H267D	H264D	192
H267E	H264E	193
H267F	H264F	194
H267G	H264G	37
H267I	H264I	195
H267K	H264K	196
H267L	H264L	197
H267M	H264M	198
H267N	H264N	36
H267P	H264P	199
H267Q	H264Q	35
H267R	H264R	200
H267S	H264S	201
H267T	H264T	202
H267V	H264V	203
H267W	H264W	204
H267Y	H264Y	205
S269A	S266A	206
S269C	S266C	207
S269D	S266D	208
S269E	S266E	209
S269F	S266F	210

Таблица 8. Варианты-кандидаты активного сайта rHuADA2 (AS)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
S269G	S266G	211
S269H	S266H	212
S269I	S266I	213
S269K	S266K	214
S269L	S266L	215
S269M	S266M	216
S269N	S266N	217
S269P	S266P	218
S269Q	S266Q	219
S269R	S266R	220
S269T	S266T	221
S269V	S266V	222
S269W	S266W	223
S269Y	S266Y	224
K270A	K267A	225
K270C	K267C	226
K270D	K267D	227
K270E	K267E	228
K270F	K267F	229
K270G	K267G	230
K270H	K267H	231
K270I	K267I	232
K270L	K267L	233
K270M	K267M	234
K270N	K267N	235
K270P	K267P	236
K270Q	K267Q	237
K270R	K267R	238
K270S	K267S	239
K270T	K267T	240
K270V	K267V	241
K270W	K267W	242
K270Y	K267Y	243
V299A	V296A	244
V299C	V296C	245
V299D	V296D	246
V299E	V296E	247
V299F	V296F	248
V299G	V296G	249
V299H	V296H	250
V299I	V296I	251

Таблица 8. Варианты-кандидаты активного сайта rHuADA2 (AS)		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
V299K	V296K	252
V299L	V296L	253
V299M	V296M	254
V299N	V296N	255
V299P	V296P	256
V299Q	V296Q	257
V299R	V296R	258
V299S	V296S	259
V299T	V296T	260
V299W	V296W	261
V299Y	V296Y	262

c. Варианты-кандидаты с измененным гликозилированием

Для создания гипергликозилированных вариантов ADA2 варианты-кандидаты были созданы путем мутации (*например,* вставка и/или аминокислотная замена) остатков для создания сайта N-гликозилирования путем введения нового мотива сайта N-гликозилирования (Asn-Xaa-Ser/Thr). В таблице 9 приведены мутации примеров вариантов-кандидатов.

Таблица 9. Гипергликозилированные варианты-кандидаты rHuADA2		
Мутация (нумерация по Zavialov)	Мутация (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
---→N4/---→A5/---→S6	---→N1/---→A2/---→S3	274
R23N/V25S	R20N/V22S	275
K374N/D376S	K371N/D373S	276
K375N/I377S	K372N/I374S	277
T406N/H408S	T403N/H405S	278
G407N/P409S	G404N/P406S	279

d. Варианты-кандидаты, у которых отсутствует домен связывания с рецептором (PRB)

Для создания вариантов ADA2, у которых отсутствует домен связывания с рецептором (PRB), остатки V102-Q147 (V99-Q144 согласно нумерации зрелой формы) или C108-T150 (C105-T147 согласно нумерации зрелой формы) были удалены и замещены на глициновый линкер различной длины (*например*, 3, 5, 7, 10 или 15; *см.* SEQ ID NO:280) или линкер (GGGGS)n различной длины (*например*, n=1, 2 или 3; *см.* SEQ ID NO: 581 и 582). В таблице 10 приведены мутации примеров вариантов-кандидатов.

Таблица 10. Варианты-кандидаты с делецией в PRB домене rHuADA2		
Мутация (нумерация по Zavialov)	Мутация (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
C108-T150del→$(Gly)_{15}$	C105-T147del→$(Gly)_{15}$	281
C108-T150del→$(Gly)_{10}$	C105-T147del→$(Gly)_{10}$	282
C108-T150del→$(Gly)_{7}$	C105-T147del→$(Gly)_{7}$	283
C108-T150del→$(Gly)_{5}$	C105-T147del→$(Gly)_{5}$	284
C108-T150del→$(Gly)_{3}$	C105-T147del→$(Gly)_{3}$	285
V102-Q147del→$(GGGGS)_{1}$	V99-Q144del→$(GGGGS)_{1}$	583
V102-Q147del→$(GGGGS)_{2}$	V99-Q144del→$(GGGGS)_{2}$	584
V102-Q147del→$(GGGGS)_{3}$	V99-Q144del→$(GGGGS)_{3}$	585
C108-T150del→$(GGGGS)_{1}$	C105-T147del→$(GGGGS)_{1}$	586
C108-T150del→$(GGGGS)_{2}$	C105-T147del→$(GGGGS)_{2}$	587
C108-T150del→$(GGGGS)_{3}$	C105-T147del→$(GGGGS)_{3}$	588

e. Варианты-кандидаты с измененным гликозилированием в домене связывания с рецептором (PRB)

Чтобы нарушить потенциальное взаимодействие ADA2 с потенциальными рецепторами, опосредованное доменом связывания с рецепторами (PRB), были созданы варианты-кандидаты ADA2 путем введения мутации (*например,* вставка и/или аминокислотная замена) остатков для создания сайта N-гликозилирования за счет введения нового мотива сайта N-гликозилирования (Asn-Xaa-Ser/Thr) в PRB домене. В таблице 11 приведены мутации примеров вариантов-кандидатов.

Таблица 11. Варианты-кандидаты с гипергликозилированием PRB домена rHuADA2		
Мутация (нумерация по Zavialov)	Мутация (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R128N/P129A	R125N/P126A	552
S130N/K132S	S127N/K129S	553
P129N/E131T	P126N/E128T	554
R115N/I117T	R112N/I114T	555
I137N/L138C/L139T	I134N/L135C/L136T	556
I137N/L138S/L139T	I134N/L135S/L136T	557
R145N/Q147S	R142N/Q144S	558
E140N/Y142T	E137N/Y139T	559
P114N/G116S	P111N/G113S	560

f. Варианты-кандидаты с измененным взаимодействием между доменом связывания с рецептором (PRB) и ADA доменом

Для создания вариантов ADA2 с измененным взамодействием между доменом связывания с рецептором (PRB) и оставшейся частью ADA2 (например, домен аденозиндезаминазы (ADA)), мутация (мутации) были введены в одну или множество аминокислот в PRB домен. Для идентификации остатков на поверхности, которые могут нарушить способность PRB домена взаимодействовать с другими остатками контакта за пределами PRB домена в ADA2, использовали основанный на структуре дизайн ADA2 в контексте его трехмерной структуры. В таблице 12 приведены мутации примеров вариантов-кандидатов.

Таблица 12. Варианты-кандидаты с измененным взаимодействием домена PRB rHuADA2

Мутация (нумерация по Zavialov)	Мутация (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
F122S	F119S	561
F122K	F119K	562
Y227R	Y224R	563
Y227N	Y224N	564
Y194S	Y191S	565
Y194D	Y191D	566
F186K	F183K	567
Y194D/Y227R	Y191D/Y224R	568
F112S	F109S	569
F112A	F109A	570
R121D	R118D	571
R121A	R118A	572
Y142T	Y139T	573
Y142A	Y139A	574
W136S	W133S	575
W136T	W133T	576
P127A	P124A	577
P127S	P124S	578

ПРИМЕР 2

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ 2 (rHuADA2) И ЕЕ ВАРИАНТОВ

A. Транзиентная экспрессия

Для транзиентной экспрессии ADA2 дикого типа и ее вариантов, созданных в Примере 1, 300 мл клеток CHO-S, 1,0 x 10^6 клеток/мл (Invitrogen, номер по каталогу 11619-012), трансфицировали 375 мкг плазмиды pCMV-Script-hADA2-FLAG или варианта плазмиды, используя реагент FreeStyle™ MAX (Life Technologies, Carlsbad, CA; номер по каталогу 16447-500). Трансфицированные клетки выращивали в течение 4 дней, и супернатант клеточной культуры собирали путем центрифугирования при 100 rpm в течение 10 мин.

Собранный супернатант использовали для очистки белка, либо зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5, либо зрелого варианта (*например,* варианты приведены в таблицах 7-12), каждый из которых имеет метку FLAG. Очистку в объеме осуществляли, используя аффинную смолу против FLAG M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, номер по каталогу A2220), согласно инструкциям производителя. ADA2 элюировали со смолы, используя пептид FLAG™. Чистоту элюированного белка оценивали, используя SDS-PAGE и эксклюзионную хроматографию (SEC). Результаты SEC подтвердили, что очищенный белок был димером. Также было проведено секвенирование N-конца, которое подтвердило, что сигнальная последовательность соответствует аминокислотным остаткам 1-29 из SEQ ID NO:2, так что очищенный зрелый белок начинается с аминокислотных остатков IDET, как приведено в SEQ ID NO: 5.

C. Клонирование и стабильная экспрессия

Ген человеческой ADA2 дикого типа (последовательность нуклеиновой кислоты приведена в SEQ ID NO: 1) или варианта с C-концевой FLAG™ меткой (последовательность нуклеиновой кислоты приведена в SEQ ID NO:8 и кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:9) субклонировали в сайт множественного клонирования (MCS) лентивирусного вектора экспрессии pLV-EF1a-MCS-IRES-GFP-Bsd. Полученный вектор экспрессии pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-Bsd (последовательность нуклеиновой кислоты приведена в SEQ ID NO: 10) использовали для создания лентивируса, способного стабильно трансфицировать клетки CHO-S. В векторе экспрессии экспрессия гена рекомбинантной человеческой ADA2

регулировалась промотором EF1a. Последовательность IRES вставляли после трансгена, за ней следовала последовательность кДНК зеленого флуоресцентного белка (GFP), используемого для идентификации трансдуцированных клеток с помощью микроскопии, в комбинации с геном устойчивости к бластицидину (*Bsd*), используемым для отбора трансдуцированных клеток. Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) вставляли после последовательности GFP-*Bsd* для усиления экспрессии гена.

Сконструированный лентивирусный вектор экспрессии pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-Bsd использовали для получения лентивируса, как описано в руководстве производителя ViraPower™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Кратко, клетки 293FT высевали в количестве 6 x 10^6 клеток на 10 см чашку для тканевых культур. Через 24 часа 9 мкг смеси ViraPower™ Packaging Mix (содержащей смесь плазмид pLP1, pLP2 и pLP/VSVG в концентрации 1 мкг/мкл в ТЕ буфере, pH 8,0, как указано производителем) и 3 мкг лентивирусной плазмиды экспрессии pLV-EF1a-hADA2-Flag-IRES-GFP-Bsd смешивали в 1,5 мл среды Opti-MEM (Life Technologies). 36 мкл липофектамина™ 2000 (LF2000; Life Technologies, Carlsbad, CA) разбавляли в 1,5 мл Opti-MEM (Life Technologies). ДНК и LF2000 аккуратно смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, чтобы ДНК и липид образовали комплексы. При этом ночную культуральную среду замещали на 5,0 мл Opti-MEM + 10% FBS без антибиотиков. Коплексы ДНК-LF2000 добавляли к клеткам 293FT для трансфекции. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с увлажненным воздухом и 5% CO_2. Среду, содержащую комплексы ДНК-LF2000, замещали на 10 мл полной среды, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с увлажненным воздухом и 5% CO_2. Супернатант собирали через 48 часов после трансфекции и среду переносили в стерильную пробирку для хранения. Среду, содержащую вирус, центрифугировали при 3000 rpm в течение 5 минут для осаждения любых клеток 293FT, которые были перенесены в процессе сбора. Супернатант аккуратно переносили в стерильную пробирку для хранения.

Для трансдукции клетки CHO-S (Life Technologies, Carlsbad, CA; номер по каталогу 16447-500) культивировали в среде CD CHO (Life Technologies, Carlsbad, CA; номер по каталогу 10743-029). Трансдукцию клеточной линии CHO-S осуществляли в шестилуночных планшетах, содержащих 2×10^7 лентивирусных инфекционных единиц (IU) и 2×10^6 клеток CHO-S в 2 мл среды CD-CHO, обогащенной 4 мМ Glutamax (Invitrogen, Carlsbad CA) и 4 мкг/мл гексадиметрина бромида (Polybrene; Biosettia, San Diego, CA). Инфицированные клетки инкубировали перемешиванием при примерно 30 rpm при 37°C в инкубаторе с увлажненным воздухом и 5% CO_2 в течение 6 часов. Клетки далее обогащали и центрифугировали при низкой скорости (1000 x *g*, 5 мин) и трансдукционную среду удаляли и замещали на свежую среду CD-CHO. Клетки переносили в T-25 мл вентилируемую колбу и возвращали в инкубатор. Через четыре дня после начала инфекции в среду добавляли 1 мкг/мл бластицидина (Invitrogen, Carlsbad, CA). Среду заменяли каждые 3-4 дня, пока конфлюентность клеток CHO-S не достигла приблизительно 90% и клетки не начали открепляться от колб. Клетки переносили во встряхиваемые колбы для наращивания клеток, организации банка клеток и продукции белка.

Кондиционированную среду собирали для очистки белка, либо зрелой ADA2, приведенной в SEQ ID NO: 5, либо зрелого варианта (*например,* приведенного в таблицах 7-12), каждый из которых имеет метку FLAG. От двух до пяти литров кондиционированной среды собирали и пропускали через аффинную смолу против FLAG M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, номер по каталогу A2220). Смолу уравновешивали приблизительно 10 объемами слоя колонки промывочного буфера (Трис забуференный физиологический раствор (TBS), pH 7,5) при скорости потока 4 мл/мин до нанесения кондиционированной среды. Загруженную колонку далее промывали ~10 объемами слоя колонки TBS и соединяли с промывочным устройством AKTA Purifier (GE Healthcare, Pittsburgh, PA), и связанный белок элюировали буфером с низким pH (0,1 M глицин-HCl при pH 2,7). Фракции сразу же нейтрализовали 1/10 объема буфера 1 M Трис-HCl, pH 8,8.

Фракции очищенных белков объединяли и диализировали в 4 литрах PBS с двумя сменами буфера, используя диализные кассеты Slide-A-Lyzer (20 кДа

MWCO; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Диализированный белковый продукт далее концентрировали, используя центрифужный концентратор Amicon Ultra (30 кДа MWCO; EMD Milipore, Billerica, MA), и финальную концентрацию белка определяли, используя набор Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Чистоту перапарата оценивали, используя SDS-PAGE, а активность аденозиндезаминазы тестировали, как описано ниже в Примере 4.

Чистота белкового препарата rHuADA2-FLAG, которую оценивали с помощью SDS-PAGE, составляла 95% или больше. Препарат также охарактеризовали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), которая показала, что белок rHuADA2-FLAG присутствует в виде вариантов с одной молекулярной массой с чистотой более 95%, которую оценивали по площади под кривой (AUC).

Альтернативно, rHuADA2 дикого типа и ее варианты экспрессировали, используя набор CHO Freedom CHO-S (Invitrogen) в соответствии с указаниями производителя и очищали, как описано выше.

ПРИМЕР 3

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ 1 (rHuADA1)

А. Клонирование ADA1 дикого типа (WT)

Ген человеческой аденозиндезаминазы 1 (ADA1) (последовательность нуклеиновой кислоты, приведенная в SEQ ID NO: 11, кодирует аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12) амплифицировали и клонировали в векторе экспрессии *E. coli* pD444-SR: T5-sRBS-ORF (DNA 2.0, Menlo Park, CA; номер по каталогу FPB-27-444) под контролем промотора, индуцируемого изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG) (DNA 2.0, Menlo Park, CA). Конструкция также содержала линкер (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:64) и С-концевую метку Strep (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO:65) для облегчения аффинной очистки белка. Аминокислотная последовательность кодируемой ADA1-Strep приведена в SEQ ID NO:3. В зрелой форме белка N-концевой остаток метионина удален, в результате чего зрелый полипептид

ADA1-Strep имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:67 (соответствует последовательности зрелого полипептида, приведенного в SEQ ID NO:66, без метки Strep).

B. Создание вариантов ADA1

Полученную конструкцию, кодирующую WT rHuADA1-Strep, использовали для введения сайт-специфических аминокислотных замен с целью создания варианта ADA1 C74S согласно нумерации на основе нумерации зрелой ADA1, приведенного в SEQ ID NO:67 (соответствует C75S с нумерацией, как у полипептида, приведенного в SEQ ID NO: 12). Вариант был создан в качестве кандидата для стабилизации активности, поскольку остаток цистеина в ADA1, обращенный к растворителю, может окисляться в плазме, что отрицательно влияет на ферментативную активность в плазме. Сайт-специфическую замену осуществляли, используя набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA; номер по каталогу 210514) в соответствии с инструкциями производителя. В зрелой форме белка зрелый вариант C74S-ADA1-Strep имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:69 (соответствует последовательности зрелого полипептида, приведенной в SEQ ID NO:70, без метки Strep).

C. Экспрессия в *E. coli*

Для экспрессии ADA1 дикого типа и ее варианта полученной клонированной конструкцией трансформировали *Escherichia coli* BL21-DE3 (Calbiochem, San Diego, CA). Трансформированных бактерий высевали на чашки с агаром и средой Luria Broth (LB) с ампицилином (TekNova, Hollister, CA), и отдельную колонию выбирали для массового культивирования. Бактерии из отобранной колонии выращивали в течение ночи (37°C, 200 rpm) в среде LB с добавлением антибиотика карбенициллина (50мг/мл; EMD Millipore, Billerica, MA). Культуру использовали для посева встряхиваемых культур в большом объеме. Культурам позволяли расти до достижения ими OD_{600}, равной приблизительно 0,8, и далее индуцировали экспрессию белка добавлением 1 мМ IPTG. Культуру далее переносили в инкубатор на 25°C и выращивали в течение ночи (~15 часов) с перемешиванием при 200 rpm. На следующий день

бактериальные клетки центрифугировали при 9000 x g в течение 30 мин и клетки в осадке лизировали на льду ультразвуком, используя ультразвуковой дезинтегратор Branson Sonifier 250 (Emerson, Danbury, CT), работающий в режиме повторяющихся импульсов с коэффициентом подачи импульсов 20% в течение приблизительно 5 мин. Бактериальный лизат далее инкубировали с лизоцимом (100 мкг/мл; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и бензоназой (50 Ед/мл; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в течение четырех часов при 4°C с аккуратным перемешиванием. Бактериальный лизат центрифугировали (5000 x g; 45 мин) для удаления клеточного дебриса.

Лизат культуры использовали для очистки белка, либо зрелой ADA1, приведенной в SEQ ID NO:66, либо зрелого варианта C74S-ADA1, приведенного в SEQ ID NO:69, каждый из которых имеет метку Strep. Осветленный лизат отбирали и фильтровали в стерильных условиях перед нанесением на колонки StrepTrap™, содержащие аффинные смолы StrepTactin™ (емкость 5 мл; GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Колонку далее соединяли с установкой для очистки AKTA, и элюировали белок раствором 2,5 мМ d-дестиобиотина в буфере (100 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA). Фракции, содержащие очищенный белок, объединяли и диализировали при 4°C в 4 литрах 1 x фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) в течение 4 часов с двумя заменами буфера, используя кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (20 кДа MWCO; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Препарат белка далее концентрировали, используя центрифужный концентратор Amicon Ultra (30 кДа MWCO; EMD Milipore, Billerica, MA), и финальную концентрацию белка определяли, используя набор Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Чистота препарата белка, которую оценивали с помощью SDS-PAGE, составила 95% или больше.

ПРИМЕР 4

ТЕСТ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ

Активность аденозиндезаминазы определяли, используя набор для анализа активности аденозиндезаминазы (ADA) (Genway, San Diego, CA; номер по каталогу BQ014EALD) с небольшими модификациями. Анализ ADA основан

на ферментативном дезаминировании аденозина до инозина, который превращается в гипоксантин пурин-нуклеозидфосфорилазой (PNP). Гипоксантин далее превращается в мочевую кислоту и пероксид водорода ксантиноксидазой (XOD). Пероксид водорода далее реагирует с N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином (EHSPT) и 4-аминоантипирином (4-AA) в присутствии пероксидазы (POD) с образованим хинонового красителя, кинетику образования которого регистрируют.

Кратко, 5 мкл образцов в двух повторах (в соответствующих разведениях для измерения стационарной, не насыщающей активности фермента) добавляли к 120 мкл реагента R1 (поставляется производителем: 50 мМ Трис HCl, pH 8,0, 2 мМ 4-AA, 0,1 Ед/мл PNP, 0,2 Ед/мл XOD, 0,6 Ед/мл пероксидазы) в лунках 96-луночного планшета в соответствии с инструкциями производителя. Смеси инкубировали при 37 °C в течение приблизительно 5 мин и к смесям добавляли 60 мкл реагента R2 (поставляется производителем: 50 мМ Трис HCl, pH 4,0, 10 мМ аденозин, 2 мМ EHSPT). Далее измеряли изменение в поглощении (ΔA) при 556 нм с течением времени при 37 °C. Одна единица ADA представляет собой количество ADA, которое образует один мкмоль инозина из аденозина в минуту при 37°C. Активность аденозиндезаминазы в мЕд/мл рассчитывали по следующей формуле:

$$1\ \text{мЕд/мл} = (\Delta A/\text{мин} \times T_v) / (S_v \times \varepsilon \times l)$$

где T_v = общий объем (185 мкл), S_v = объем образца (5 мкл), ε = $32{,}2 \times 10^{-3}$ мкМ$^{-1}$см$^{-1}$, l = 0,5 см.

ПРИМЕР 5

СТАБИЛЬНОСТЬ ADA1 В ПЛАЗМЕ *IN VITRO* В СРАВНЕНИИ С ADA2

С целью тестирования препаратов рекомбинантных белков ферментативную активность очищенного препарата rHuADA1 WT, rHuADA1-C74S и rHuADA2 оценивали до и после инкубации в плазме крови млекопитающих в течение 24-часового периода. Вариант rHuADA1-C74S также тестировали, чтобы определить, может ли стабильность в плазме быть улучшена путем замены остатка цистеина, обращенного в растворитель.

A. Инкубация препаратов очищенной rHuADA1 и rHuADA2 в плазме

Очищенные препараты rHuADA1, rHuADA2 и rHuADA1-C74S индивидуально добавляли к *ex vivo* 25% плазме мышей BALB/c до финальной концентрации 0,17 мг/мл (соответствует приблизительно эквивалентной дозе 10 мг/кг для мышей). Образцы инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. В качестве контроля белки индивидуально инкубировали в концентрации 0,17 мг/мл в PBS, содержащем 0,2% BSA (в качестве стабилизатора). Через 0, 4 и 24 часа после инкубации отбирали 3 небольшие акликвоты каждого образца, инкубируемого в плазме, и контрольного образца, инкубируемого в PBS, и хранили их при -20 °C для последующих анализов.

Стабильность белков в *ex vivo* плазме после инкубации определяли, сравнивая изменения в ферментативной активности аденозиндезаминазы, используя способ, описанный в Примере 4. Молекулярную массу и стабильность белка также определяли с помощью Вестерн блоттинга с целью обнаружения любой возможной деградации белка. Приблизительно 200 нг белка индивидуально оценивали, используя вестерг блоттинг, и полосы белков обнаруживали, используя ECL (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Кроличье антитело против человеческой ADA1 (Abcam, Cambridge, MA) и козье антитело против кроличьего антитела, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) (EMD Millipore, Billerica, MA) использовали в качестве первичного и вторичного антител, соответственно, для обнаружения rHuADA1. Антитело анти-FLAG-HRP (Abcam) использовали для обнаружения rHuADA2.

B. Результаты

1. Стабильность rHuADA1

В таблице 13 приведены среднее значение и стандартное отклонение (stdev) для активности аденозиндезаминазы WT rHuADA1 и rHuADA1-C74S. Результаты показывают значительное снижение активности rHuADA1 после 24 часов инкубации в плазме при 37 °C. Например, меньше 1% активности сохранилось после обработки плазмой в течение 24 часов, тогда как более 80% активности сохранилось при обработке контрольного образца раствором PBS/BSA в течение такого же периода времени. Наблюдаемое уменьшение активности не было вызвано деградацией белка, поскольку уровень белка был

относительно постоянным во всех временных точках, согласно измерениям с помощью вестерн блоттинга.

Результаты также показали, что остаток цистеина (C74), обращенный в растворитель, не связан с отрицательным воздействием плазмы на активность фермента, поскольку аналогичные результаты были получены для варианта C74S. Например, несмотря на то, что у варианта отсутствует экспонированный наружу тиол в положении 74, для варианта также наблюдается сильное уменьшение активности после 24 часов инкубации в плазме. Результаты показали, что через 24 часа примерно 1% активности варианта фермента сохранился после обработки плазмой, тогда как более 80% активности сохранилось при обработке контрольного образца раствором PBS/BSA.

В норме, ADA1 экспрессируется внутриклеточно и транслоцируется и ассоциируется с внеклеточной дипептидилпептидазой-4 (DPPIV). Эти результаты демонстрируют, что вне этой среды ADA1 быстро инактивируется при воздействии плазмы и что мутация цистеина 74, находящегося на поверхности белка, не предотвращает инактивацию.

Таблица 13. Активность rHuADA1 и rHuADA1-C74S после инкубации с сывороткой

	Время (ч)	Инкубация с PBS среднее значение (мЕд/мл)	Инкубация с плазмой среднее значение (мЕд/мл)	Инкубация с PBS Stdev	Инкубация с плазмой Stdev
rHuADA1	0	61077,0	71663,6	2352,2	2461,4
	4	59544,8	46772,1	3352,5	4645,3
	24	50287,9	673,6	700,5	135,7
rHuADA1-C74S	0	43031,9	59632,4	2695,6	4890,5
	4	44682,4	39636,7	3739,6	1671,4
	24	37492,2	616,6	751,4	44,7

2. Стабильность rHuADA2

В таблице 14 ниже приведены среднее значение и стандартное отклонение (stdev) для активности аденозиндезаминазы rHuADA2 после 24 часов инкубации с плазмой. По сравнению с результатами для ADA1 эти результаты показали, что ADA2 по существу более стабильна в плазме через 24

часа инкубации при 37 °C. Например, примерно 65% активности сохранялось после обработки плазмой в течение 24 часов, при этом не наблюдалось изменений в активности при обработке контрольного образца раствором PBS/BSA в течение такого же периода времени.

Таблица 14. Активность rHuADA2 после инкубации с сывороткой

Время (ч)	Инкубация с PBS среднее значение (мЕд/мл)	Инкубация с плазмой среднее значение (мЕд/мл)	Инкубация с PBS Stdev	Инкубация с плазмой Stdev
0	9140,5	10988,4	1058,8	1827,9
4	9584,6	10936,1	1697,8	1784,5
24	9832,1	7147,8	1310,6	1014,8

ПРИМЕР 6

ВЛИЯНИЕ ADA2 НА ОПОСРЕДОВАННУЮ АДЕНОЗИНОМ МОДУЛЯЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА

Внеклеточный аденозин является воспалительным модулятором иммунных ответов, и повышенные уровни аденозина в опухолевом микроокружении могут снижать и/или ингибировать эффекторную функцию Т и NK клеток, что благоприятствует росту опухоли. Чтобы оценить, можно ли отслеживать эффекты аденозина путем оценки пролиферации иммунных клеток, были проведены эксперименты по пролиферации со смесью NK и Т клеток (NK/T). Кроме того, были проведены эксперименты для оценки того, может ли rHuADA2, способная ферментативным путем превращать аденозин в инозин, защищать иммунные клетки от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации.

А. Оценка влияния аденозина на пролиферацию NK/T клеток

Смесь NK и Т клеток (NK/T) получали из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров (PBMC). Кратко, 10 x 10^7 человеческих PBMC культивировали в течение 6-7 дней в среде для выращивания стволовых клеток (SCGM; номер для заказа 20802-0500, CellGenix, Freiburg, Germany) с 5% человеческой сыворотки от доноров с группой крови AB (человеческая AB сыворотка; номер по каталогу 35-060-Cl, Mediatech, Manassas, VA) в присутствии 20 нг/мл антитела против CD3

(eBioscience, San Diego, CA; номер по каталогу 16-0039) и 500 МЕ/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина 2 (rhIL-2; номер по каталогу 200-02, PeproTech, Rocky Hill, NJ). Клетки далее культивировали в течение дополнительных 2-3 недель в SCGM в присутствии 500 МЕ/мл rhIL-2. NK/T клетки культивировали в течение 2-4 недель и использовали в экспериментах.

Для проверки опосредованного аденозином ингибирования пролиферации NK/T клеток NK/T клетки (10000 клеток/лунку) выращивали в 96-луночных белых планшетах с прозрачным дном в объеме 200 мкл. Клетки обрабатывали 20 мкл аденозина (SKU номер A925, Sigma Aldrich) в концентрациях, полученных сериями последовательных разведений в 3 раза начальной концентрации 1 мМ, т.е., 1 мМ, 300 мкМ, 100 мкМ, 30 мкМ, 10 мкМ, 3 мкМ, 1 мкМ, 0,3 мкМ и 0,1 мкМ. NK/T клетки оставляли расти в течение 5 дней в инкубаторе для тканевых культур с увлажнением при 37°C с 5% CO_2. Через 5 дней после обработки клетки центрифугировали в 96-луночном планшете при 12000 rpm в течение 5 мин. 100 мкл среды удаляли из каждой лунки, после чего добавляли 100 мкл реагента Cell Titer Glow (CTG) (номер по каталогу G7570, Promega, Madison, WI) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин перед измерением люминесценции на планшетном ридере SpectraMax M3 в соответствии с инструкциями производителя. Среднюю выживаемость клеток (%) определяли путем сравнения измеренной люминесценции с контрольными клетками, не обработанными аденозином.

Результаты приведены в Таблице 15. Результаты показали, что обработка NK/T клеток аденозином в течение 5 дней приводит к дозозависимому ингибированию аденозином пролиферации NK/T клеток. IC_{50}, концентрация аденозина, при которой ответ снижается в два раза, составила 16,2 мкМ.

Таблица 15. Опосредованное аденозином ингибирование пролиферации NK/T

Концентрация аденозина (мкМ)	**Средняя выживаемость клеток (%)**	**Стандартное отклонение**
1000	15,82	0,44
300	13,65	1,04
100	26,01	1,51
30	36,84	0,96

10	70,33	1,33
3	110,07	2,07
1	121,11	1,8
0,3	101,19	1,14
0,1	106,67	1,21

B. Оценка влияния ADA2 на опосредованное аденозином ингибирование пролиферации NK/T клеток

Проводили тестирование, чтобы оценить, способна ли rHuADA2 защищать от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации NK/T клеток при концентрации аденозина 1 мМ. NK/T клетки (10000 клеток/лунку) выращивали в 96-луночных белых планшетах с прозрачным дном в суммарном объеме 180 мкл. Клетки обрабатывали 20 мкл rHuADA2 в концентрациях, полученных сериями последовательных разведений в 3 раза, до финальной концентрации rHuADA2 100 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ и 0,03 нМ, и далее в каждую лунку также добавляли 20 мкл аденозина в концентрации 1 мМ. После обработки NK/T клетки культивировали, обрабатывали и измеряли люминесценцию, как описано выше. Среднюю выживаемость клеток (%) определяли путем сравнения измеренной люминесценции с контрольными клетками, не обработанными аденозином или rHuADA2.

Результаты приведены в таблице 16. Результаты показали, что rHuADA2 защищает от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации NK/T клеток дозозависимым образом. EC_{50}, концентрация rHuADA2, которая индуцирует ответ, величина которого находится посередине между базовой линией и максимальным значением, составила 8,5 нМ.

Таблица 16. ADA2 защищает от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации (1 мМ аденозина)

Концентрация rHuADA2 (nM)	**Средняя выживаемость клеток (%)**	**Стандартное отклонение**
100 нМ	120,6	2,76
30 нМ	105,5	2,86
10 нМ	83,82	2,17
3 нМ	41,98	0,9
1 нМ	25,73	0,3

Таблица 16. ADA2 защищает от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации (1 мМ аденозина)		
Концентрация rHuADA2 (nM)	**Средняя выживаемость клеток (%)**	**Стандартное отклонение**
0,3 нМ	18,33	0,12
0,1 нМ	18,4	0,72
0,03 нМ	16,03	0,47

Также были проведены эксперименты для оценки влияния rHuADA2 на обратимое опосредованное аденозином ингибирование пролиферации NK/T клеток при различных концентрациях аденозина. Эксперименты были проведены аналогичным образом, как описано выше, с финальной концентрацией аденозина 1 мМ, 100, 50 или 25 мкМ и финальной концентрацией rHuADA2 100 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ и 0,03 нМ.

Результаты приведены в таблице 17. Аналогично результатам, описанным выше, rHuADA2 дозозависимым способом защищала пролиферацию NK/T клеток при различных концентрациях аденозина. Значения EC_{50} для rHuADA2 при разных фиксированных концентрациях аденозина приведены в таблице 18. Результаты показывают, что аденозин ингибирует пролиферацию NK/T клеток и что добавление rHuADA2 может защитить человеческие NK/T клетки от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации.

Таблица 17. ADA2 защищает от опосредованного аденозином ингибирования пролиферации при различных концентрациях аденозина и ADA2								
ADA2 (нМ)	**1 мМ аденозина**		**100 мкМ аденозина**		**50 мкМ аденозина**		**25 мкМ аденозина**	
	MS%	**SD**	**MS%**	**SD**	**MS%**	**SD**	**MS%**	**SD**
100 нМ	96,3	1,2	109	2,3	116,9	1,5	120,6	2,5
30 нМ	79,1	1,5	114,4	2,6	114,7	2,3	117,2	1,3
10 нМ	67,1	1,4	108,3	2,1	105,9	1,2	121,2	1,1
3 нМ	41,4	1	91,6	2,3	94	0,9	107,4	1,1
1 нМ	22,6	0,5	71,7	1,7	80,2	0,6	99,3	1,5
0,3 нМ	18,3	0,1	57,8	0,7	64,8	0,8	90,5	1
0,1 нМ	16,3	0,2	43,8	0,8	76,6	0,9	89,6	0,9
0,03 нМ	15,6	0,2	45,9	1,6	71,2	0,5	81,7	1

MS% = средняя выживаемость (%)
SD – стандартное отклонение

Таблица 18. Значения EC_{50} для ADA2 и различных концентраций аденозина	
Концентрация аденозина	**EC_{50} для rHuADA2**
1 мМ	7,2 нМ
100 мкМ	1,5 нМ
50 мкМ	3,8 нМ
25 мкМ	1,5 нМ

ПРИМЕР 7

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВАРИАНТОВ ADA2 С МОДИФИКАЦИЯМИ В САЙТЕ СВЯЗЫВАНИЯ С ГЕПАРИНОМ, КОТОРЫЕ ДЕМОНСТРИРУЮТ ПОНИЖЕННОЕ СВЯЗЫВАНИЕ С ГЕПАРИНОМ

Отобранные варианты-кандидаты, описанные в таблице 7 выше, имеющие аминокислотную замену по остатку, который участвует в связывании с гепарином, были подвергнуты скринингу для оценки уменьшения связывания с гепарином, если оно происходит. В таблице 19 перечислены варианты, которые были протестированы. Связывание с гепарином оценивали с помощью аффинной хроматографии с гепарином и/или с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Кроме того, оценивали активность аденозиндезаминазы вариантов. Для проведения экспериментов получали очищенную rHuADA2 WT и варианты rHuADA2 в концентрации 0,3 мг/мл, чтобы провести нормализацию на количество белка в каждом эксперименте.

A. Связывание с гепарином

1. Аффинная хроматография с гепарином

Для оценки связывания вариантов с гепарином и идентификации связывающих гепарин вариантов провели аффинную хроматографию с гепарином. Связывание с гепарином тестировали, смешивая 35 мкл rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2 с 20 мкл смолы гепарин-Sepharose™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA; номер по каталогу 17-0998-01) и инкубируя смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь далее центрифугировали через центрифужный фильтр 0,22 мкм и фильтрат, содержащий несвязавшийся белок, собирали для анализа в SDS-PAGE геле. 35 мкл 1,5 М NaCl добавляли к смоле гепарин-Sepharose, инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 10 мин и элюировали с неё оставшийся связавшийся с гепарином белок. Образцы очищенной rHuADA2 WT и тестируемые варианты rHuADA2, до и после

смешивания со смолой гепарин-Sepharose, анализировали методом SDS-PAGE, чтобы сравнить степень связывания с гепарином.

Результаты приведены в таблице 19. Результаты показывают, что было элюировано меньше белка для 16 из 25 протестированных вариантов, что свидетельствует о том, что эти варианты обладают пониженным связыванием с гепарином по сравнению с rHuADA2 WT. Для других вариантов количество элюированного белка аналогично rHuADA2 WT.

Таблица 19. Связывание на колонке с гепарином вариантов ADA2 HBP

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Связывание на колонке с гепарином
K14A	K11A	Аналогично WT
K14D	K11D	Аналогично WT
K14E	K11E	Аналогично WT
K16A	K13A	Аналогично WT
K16D	K13D	Аналогично WT
K16E	K13E	Аналогично WT
K374A	K371A	Пониженное
K374D	K371D	Пониженное
K374E	K371E	Пониженное
K375A	K372A	Пониженное
K375D	K372D	Пониженное
K375E	K372E	Пониженное
K455A	K452A	Аналогично WT
K455D	K452D	Аналогично WT
K455E	K452E	Пониженное
R23A	R20A	Пониженное
R23D	R20D	Пониженное
R23E	R20E	Пониженное
R369A	R366A	Пониженное
R369D	R366D	Пониженное
R369E	R366E	Пониженное
K14A/R23A	K11A/R20A	Пониженное
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	Пониженное
R23A/K374A	R20A/K371A	Пониженное
K14A/K374A	K11A/K371A	Пониженное

2. ELISA анализ способности связываться с гепарином

Для подтверждения уменьшения способности связываться с гепарином вариантов rHuADA2 HBP, которые ранее были подвергнуты скринингу, проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), используя микротитрационный планшет, покрытый гепарином. 96-луночный планшет покрывали 100 мкл натриевой соли гепарина в концентрации 200 мкг/мл (Calibochem, EMD Milipore, Billerica, MA; номер по каталогу 375095) в Na_2CO_3 буфере с pH 9,6 в течение ноч при 4°C. Лунки блокировали 5% молоком в PBS и отмывали 6 раз PBS. 3 мкМ отобранных вариантов rHuADA2 (смотрите таблицу 20), rHuADA2 WT (положительный контроль) и WT rHuADA1 (отрицательный контроль) добавляли в отдельные лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре с последующей отмывкой 6 раз в PBS. 100 мкл разбавленного 1:1000 анти-FLAG антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Abcam, Cambridge, UK; номер по каталогу Ab1238) добавляли в лунки для обнаружения связывания и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакции ELISA проводили, добавляя раствор субстрата 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (TMB) (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) в соответствии с инструкциями производителя, и измеряли оптическую плотность при 450 нМ (OD_{450}) с помощью планшетного ридера.

Результаты приведены в таблице 20, в которой указаны средняя OD_{450} и стандартное отклонение (Stdev) для протестированных вариантов. Результаты показали, что для ADA2 WT измеренная OD самая высокая среди всех протестированных белков, что свидетельствует о связывании с гепарином, тогда как для отрицательного контроля ADA1 детектируемого сигнала обнаружено не было. Результаты показали, что для всех протестированных вариантов, которые выше были идентифицированы как имеющие пониженное связывание с гепарином, измеренная OD меньше, чем для ADA2 WT, и, следовательно, они слабее связываются с планшетами, покрытыми гепарином. Следовательно, в соответствии с результатами выше, результаты показали ослабленное связывание с гепарином по сравнению с человеческой rHuADA2 дикого типа.

Таблица 20. ELISA анализ связывания с гепарином отобранных вариантов ADA2 HBP

	Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Средняя OD_{450}	Stdev

Таблица 20. ELISA анализ связывания с гепарином отобранных вариантов ADA2 HBP				
	Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Средняя OD_{450}	Stdev
эксперимент 1	K374D	K371D	0,15	0,02
	K374E	K371E	0,11	0,01
	K375D	K372D	0,2	0,07
	K375E	K372E	0,21	0,05
	WT ADA2	WT ADA2	0,49	0,02
	WT ADA1	WT ADA1	0,07	0,01
эксперимент 2	K455E	K452E	0,26	1
	R23E	R20E	0,2	0
	R369E	R366E	0,18	0,04
	R23A/R374A	R20A/R371A	0,17	0,08
	WT ADA2	WT ADA2	0,55	0,15
	WT ADA1	WT ADA1	0,06	0,01

B. Оценка активности аденозиндезаминазы

Активность аденозиндезаминазы rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2, протестированных выше, определяли, используя анализ активности аденозиндезаминазы (ADA), описанный в Примере 4. Активность оценивали для очищенной rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2, разбавленных до 5 мкг/мл, и далее последовательно разбавленных в 2 раза, так что в итоге получилось 4 измерения.

В таблице 21 приведены результаты. В последнем столбце приведена относительная ферментативная активность (% активности по сравнению с WT) по сравнению с rHuADA2 WT.

Результаты показывают, что большинство вариантов, которые обладают пониженным связыванием с гепарином, обладают либо аналогичной, либо повышенной активностью аденозиндезаминазы по сравнению с WT ADA2. В частности, варианты R23E, K374D, K374E, K375D, K375E, K455D, K455E и R369E согласно нумерации по Zavialov (R20E, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D, K452E и R366E, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) не только обладают ослабленным связыванием с гепарином, но также демонстрируют улучшенную ферментативную активность.

Наоборот, варианты R23A, R23D и R369A (R20A, R20D и R366A, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) обладают пониженным связыванием с гепарином, но также пониженной активностью аденозиндезаминазы.

Результаты показывают, что вариант K14E (K11E согласно нумерации зрелой формы) и вариант K455D (K452D согласно нумерации зрелой формы) обладает улучшенной ферментативной активностью по сравнению с rHuADA2 WT, тогда как связывание с гепарином не было ослаблено.

Таблица 21. Активность аденозиндезаминазы вариантов ADA2

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	ΔA/ мин	мЕд/ мл	stdev	% активности по сравнению с WT
K14A	K11A	4,9	11,4	1,2	14,6
K14D	K11D	8,1	18,7	0,2	24
K14E	K11E	38,8	89,1	2,8	114,2
K16A	K13A	12,2	28	1,8	35,9
K16D	K13D	29,3	67,3	18,1	86,3
K16E	K13E	7,1	16,3	2,4	20,9
K374A	K371A	25,8	59,2	16,3	75,9
K374D	K371D	117,3	269,8	6,4	345,9
K374E	K371E	136,5	313,8	17	402,3
K375A	K372A	35,5	81,8	15,4	104,8
K375D	K372D	53,7	123,5	10,9	158,3
K375E	K372E	47	108,1	10	138,6
K455A	K452A	6,1	14	2,8	18
K455D	K452D	42,6	97,9	12,6	125,5
K455E	K452E	55,4	127,3	6,1	163,2
R23A	R20A	23,2	53,3	4,8	68,4
R23D	R20D	6,9	15,9	4,2	20,3
R23E	R20E	70,2	161,6	26,3	207,1
R369A	R366A	14,9	34,3	5,5	44
R369D	R366D	34,9	80,2	3,6	102,8
R369E	R366E	50,4	115,9	28,9	148,5
K14A/R23A	K11A/R20A	42,1	96,9	0,7	124,2
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	31,7	72,8	10,1	93,3
R23A/K374A	R20A/K371A	51,1	117,6	7,1	150,7
K14A/K374A	K11A/K371A	34,1	78,4	2,2	100,5

Таблица 21. Активность аденозиндезаминазы вариантов ADA2					
Замена (нумерация по Zavialov)	**Замена (нумерация зрелой формы)**	**ΔA/ мин**	**мЕд/ мл**	**stdev**	**% активности по сравнению с WT**
WT ADA2	WT ADA2	33,9	78	1,2	100

ПРИМЕР 8

ПЕГИЛИРОВАНИЕ rHuADA2 И ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ И СВЯЗЫВАНИЯ С ГЕПАРИНОМ

rHuADA2, вариант K374D-ADA2 (K371D согласно нумерации зрелой формы) или вариант R23E-ADA2 (R20E согласно нумерации зрелой формы) были пегилированы по лизинам, экспонированным на поверхности, реакцией с линейным PEG-20K. Пегилированную-rHuADA2 или ее варианты оценивали на способность связываться с гепарином и активность аденозиндезаминазы.

A. Пегилирование

Для осуществления пегилирования фермента rHuADA2 WT, вариант rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) или вариант rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) в концентрации 3 мг/мл по-отдельности смешивали с линейным PEG-20K (JenKem Technology, Plano, TX; номер по каталогу M-SCM-20K) в молярном соотношении 1:15 и инкубировали при 4°C в течение 16 часов. Реакционную смесь центрифугировали через центрифужный фильтр 0,22 мкм и собирали фильтрат, содержащий пегилированный фермент.

Степень пегилирования оценивали с помощью SDS-PAGE анализа. Результаты показывают, что, по меньшей мере, 80% rHuADA2 WT, rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) и rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) были пегилированы в условиях реакции, о чем свидетельствует уменьшение интенсивности полосы немодифицированной rHuADA2, сопровождающееся появлением множества более крупных полос, соответствующих пегилированным молекулам rHuADA2.

B. Определение связывания с гепарином методом ELISA

Связывание с гепарином пегилированной rHuADA2 или ее вариантов оценивали с помощью ELISA с захватом. Связывание с гепарином rHuADA1 оценивали в качестве отрицательного контроля. 100 мкл 0,2 мг/мл биотина-

гепарина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; номер по каталогу B9806-10MG) добавляли в лунки 96-луночного планшета, покрытого стрептавидином (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; номер по каталогу 15520), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшет промывали 6 раз PBS. Далее 150 мкл 1 мкМ пегилированной rHuADA2 добавляли в лунки планшета, покрытого гепарином, который титровали 3 х последовательными разведениями, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Планшет далее 6 раз промывали PBS. 1000 х разведение козьего антитела HRP-anti-FLAG pAb (Abcam, Cambridge, UK; номер по каталогу Ab1238) добавляли в лунки планшета для ELISA и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшет для ELISA далее 6 раз промывали фосфатно-солевым буферным раствором с Tween (PBST), добавляли раствор субстрата 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (TMB) для развития окраски (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) в соответствии с инструкциями производителя и измеряли оптическую плотность при 450 нМ (OD_{450}) с помощью планшетного ридера.

В таблице 22 приведены значения средней OD_{450} и стандартного отклонения (Stdev), полученные в анализе ELISA с захватом для пегилированной rHuADA2 дикого типа и ее вариантов. Результаты показывают, что пегилированная rHuADA2 и ее варианты значительно слабее связываются с гепарином. Для пегилированных вариантов rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) и rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) пегилирование привело к дополнительному снижению связывания с гепарином по сравнению с не пегилированными формами со сниженным связыванием с гепарином. Таким образом, эти результаты указывают на то, что модификация белка rHuADA2 фрагментом PEG снижает связывание с гепарином за счет стерической блокады и/или изменения электростатических зарядов на поверхности rHuADA2.

Таблица 22. Анализ связывания с гепарином пегилированной ADA2 WT и ее вариантов методом ELISA

Вариант (нумерация по Zavialov)	**Вариант (нумерация зрелой формы)**	**Средняя OD_{450}**	**Stdev**
K374D	K371D	0,87	0,03

Таблица 22. Анализ связывания с гепарином пегилированной ADA2 WT и ее вариантов методом ELISA			
Вариант (нумерация по Zavialov)	**Вариант (нумерация зрелой формы)**	**Средняя OD_{450}**	**Stdev**
PEG-K374D	PEG-K371D	0,15	0,05
R23E	R20E	0,71	0,04
PEG-R23E	PEG-R20E	0,55	0,02
WT ADA2	WT ADA2	2,31	0,01
PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	0,75	0,04
WT ADA1	WT ADA1	-0,02	0

C. Анализ активности аденозиндезаминазы

Активность аденозиндезаминазы пегилированной rHuADA2 и ее вариантов оценивали способом, описанным в Примере 4, и сравнивали с активностью соответствующей не пегилированной формы.

Результаты приведены в таблице 23. Результаты показывают, что пегилированная rHuADA2 WT обладает активностью аденозиндезаминазы, сопоставимой с не пегилированной формой. Аналогично, пегилированные варианты rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) и rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) также обладают активностью аденозиндезаминазы, сопоставимой с не пегилированными формами. Хотя rHuADA2 WT содержит 32 остатка лизина как мономер, и 64 остатка лизина как димер, пегилирование остатков лизина не влияет на активность аденозиндезаминазы rHuADA2.

Таблица 23: Активность аденозиндезаминазы пегилированной ADA2 WT и ее вариантов				
Вариант (нумерация по Zavialov)	**Вариант (нумерация зрелой формы)**	**мЕд/мл**	**stdev**	**% от WT**
K374D	K371D	162,9	2,2	134
R23E	R20E	129,9	0,4	106,8
WT	WT	121,6	2,3	100
PEG-K374D	PEG-K371D	142	7,1	116,8
PEG-R23E	PEG-R20E	115,6	3,9	95,1
PEG-WT	PEG-WT	124,2	5,5	102,2

D. Заключение

Результаты экспериментов демонстрируют, что пегилирование вариантов rHuADA2 снижает связывание с гепарином в дополнение к ослаблению связыванию гепарина, обусловленному аминокислотной заменой, но без потери активности аденозиндезаминазы. Таким образом, результаты показывают, что пегилирование гепарин-связывающих вариантов может улучшить фармакокинетические свойства вариантов rHuADA2 без влияния на активность аденозиндезаминазы. Пегилирование может быть использовано вместо мутции для ослабления связывания с гепарином.

ПРИМЕР 9

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ ВАРИАНТОВ rHuADA2, ADA2 И ИХ ПЕГИЛИРОВАННЫХ ФОРМ *IN VIVO*

Фармакокинетику (PK) не пегилированной и пегилированной форм вариантов rHuADA2 WT, ADA2-K374D и ADA2-R23E согласно нумерации по Zavialov (K371D и R20E, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) анализировали в иммунокомпетентной мышиной модели.

A. План исследования

Пятьдесят четыре (54) самца мышей BALB/c разделили на шесть (6) групп дозирования и далее разделили на три (3) группы, у каждой из которых отбирали кровь в разные моменты времени. Таким образом, мышей случайным образом распределяли всего на восемнадцать (18) групп. Мышей взвешивали до начала исследования и случайным образом распределяли на 18 групп на основе их массы тела. В каждой группе три группы мышей (3) использовали для дозирования каждого тестируемого препарата, чтобы предотвратить избыточный забор крови у животного. Для измерения начальных уровней ADA2 образец крови отбирали у 12 случайным образом выбранных мышей, и плазму крови получали, используя в качестве антикоагулянта калиевую соль (K_3) этилендиаминтетрауксусной кислоты (K_3-EDTA). Кровь отбирали путем прокола поднижнечелюстной вены.

Каждой мыши путем внутривенной инъекции в хвостовую вену вводили дозу 7,5 мг/кг одного из шести тестируемых препаратов ADA2, приведенных в таблице 24, *т.е.*, rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы),

PEG-rHuADA2-K374D (PEG-K371D согласно нумерации зрелой формы), rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы), PEG-rHuADA2-R23E (PEG-R20E согласно нумерации зрелой формы) или WT ADA2 и PEG-WT ADA2. Пегилированные варианты ADA2 были получены способом пегилирования, описанным в Примере 8.A. Концентрация каждого тестируемого препарата составила 1,5 мг/мл, а объем дозы, следовательно, составил 93-119 мкл в зависимости от массы тела (BW) мыши. Объемы доз и массы тела индивидуальных животных приведены в таблице 25.

Кровь отбирали в определенные моменты времени от соответствующих групп мышей, как указано ниже в таблице 24, и держали на льду до получения плазмы. Плазму получали центрифугированием крови (500 x g в течение 5 мин при 4°C), далее переносили плазму в чистую пробирку и сразу замораживали при -80°C до проведения анализа на активность аденозиндезаминазы. Активность аденозиндезаминазы определяли, как описано в Примере 4. Рассчитывали время полужизни, или время, необходимое для снижения активности белков ADA2 в два раза. Кроме того, была измерена общая экспозиция путем расчета площади под кривой зависимости концентрации от времени (AUC).

Таблица 24. План фармакокинетического исследования для пегилированной ADA2 WT и ее вариантов

Группа #	Тестируемый препарат		Число животных	Доза	Временные точки сбора крови после введения дозы (часы)
	(нумерация по Zavialo)	(нумерация зрелой формы)			
1	K374D	K371D	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
2			3		1, 8
3			3		4, 24
4	PEG-K374D	PEG-K371D	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
5			3		1, 8
6			3		4, 24
7	R23E	R20E	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
8			3		1, 8
9			3		4, 24
10	PEG-R23E	PEG-R20E	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
11			3		1, 8
12			3		4, 24
13	WT ADA2	WT ADA2	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
14			3		1, 8
15			3		4, 24

Таблица 24. План фармакокинетического исследования для пегилированной ADA2 WT и ее вариантов

Группа #	Тестируемый препарат		Число животных	Доза	Временные точки сбора крови после введения дозы (часы)
	(нумерация по Zavialo)	(нумерация зрелой формы)			
16	PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	3	7,5 мг/кг	0,25, 2
17			3		1, 8
18			3		4, 24

Таблица 25. Масса тела и дозирование для фармакокинетического анализа пегилированной ADA2 WT и ее вариантов

Тестируемый препарат		Группа #	ID# животного	BW	мг тестируемого изделия	объем (мкл)
(нумерация по Zavialov)	(нумерация зрелой формы)					
K374D	K371D	1	817	17,7	0,1328	89
			850	21	0,1575	105
			832	23,7	0,1778	119
		2	822	18,6	0,1395	93
			830	21	0,1575	105
			819	23,7	0,1778	119
		3	821	18,9	0,1418	95
			812	21,1	0,1583	106
			844	23,3	0,1748	117
PEG-K374D	PEG-K371D	4	823	19,2	0,144	96
			801	20,9	0,1568	105
			848	22,8	0,171	114
		5	841	19,3	0,1448	97
			836	21,1	0,1583	106
			837	22,8	0,171	114
		6	826	19,7	0,1478	99
			835	20,8	0,156	104
			853	22,6	0,1695	113
R23E	R20E	7	828	19,8	0,1485	99
			807	21,2	0,159	106
			834	22,4	0,168	112
		8	820	19,9	0,1493	100
			840	20,7	0,1553	104
			839	22,3	0,1673	112
		9	810	20	0,15	100

Таблица 25. Масса тела и дозирование для фармакокинетического анализа пегилированной ADA2 WT и ее вариантов

Тестируемый препарат		Группа #	ID# животного	BW	мг тестируемого изделия	объем (мкл)
(нумерация по Zavialov)	(нумерация зрелой формы)					
			809	21,2	0,159	106
			842	22,2	0,1665	111
PEG-R23E	PEG-R20E	10	815	20	0,15	100
			813	20,6	0,1545	103
			827	22,2	0,1665	111
		11	824	20	0,15	100
			852	21,2	0,159	106
			833	22,1	0,1658	111
		12	825	20	0,15	100
			808	20,6	0,1545	103
			845	22	0,165	110
WT ADA2	WT ADA2	13	838	20	0,15	100
			818	21,3	0,1598	107
			843	21,9	0,1643	110
		14	846	20	0,15	100
			814	20,5	0,1538	103
			805	21,8	0,1635	109
		15	849	20	0,15	100
			851	21,3	0,1598	107
			803	21,8	0,1635	109
PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	16	811	20,2	0,1515	101
			829	20,4	0,153	102
			831	21,7	0,1628	109
		17	802	20,3	0,1523	102
			854	21,4	0,1605	107
			804	21,7	0,1628	109
		18	806	20,3	0,1523	102
			847	20,3	0,1523	102
			816	21,5	0,1613	108

B. Результаты

1. Фармакокинетика не пегилированной rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2

Фармакокинетические (PK) свойства rHuADA2 WT по сравнению с вариантами ADA2-K374D и ADA2-R23E согласно нумерации по Zavialov (K371D и R20E, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) приведены в таблицах 26 и 27. В таблице 26 приведена общая экспозиция, рассчитанная по площади под кривой (AUC), и в таблице 27 приведено время полужизни ($t_{1/2}$). Результаты показывают, что каждый из вариантов обладает улучшенными фармакокинетическими параметрами по сравнению с ADA2 дикого типа. Например, для варианта rHuADA2-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) AUC на 19% больше, чем для rHuADA2 WT, и время полужизни на 119% длиннее, чем для rHuADA2 WT. Для варианта rHuADA2-K374D AUC на 128% больше, чем для rHuADA2 WT, и время полужизни на 230% длиннее, чем для rHuADA2 WT.

Таблица 26. Сравнение общей экспозиции – Площадь под кривой (AUC): ADA2 WT и HBP варианты

Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	AUC (мЕд*ч)/мл	Процентное увеличение AUC по сравнению с WT ADA2
WT	WT	32883	---
R23E	R20E	39033	19
K374D	K371D	74983	128

Таблица 27. Сравнение времени полужизни ($t_{1/2}$): ADA2 WT и HBP варианты

Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	Время полужизни ($t_{1/2}$) (мин)	Процентное увеличение $t_{1/2}$ по сравнению с WT ADA2
WT	WT	69	---
R23E	R20E	151	119
K374D	K371D	228	230

2. Фармакокинетика пегилированной rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2

Фармакокинетические (PK) свойства нативной и пегилированной rHuADA2 WT по сравнению с пегилированными формами вариантов, PEG-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) и PEG-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) приведены в таблицах 28 и 29. В таблице 28

приведена общая экспозиция, рассчитанная по площади под кривой (AUC), и в таблице 29 приведено время полужизни ($t_{1/2}$).

Для ADA2 дикого типа результаты показывают, что пегилирование значительно улучшает фармакокинетический профиль. Результаты показывают, что для PEG-WT ADA2 AUC на 4291% выше, чем для не пегилированной WT ADA2, и время полужизни на 1078% длиннее, чем для не пегилированной WT ADA2. Аналогично, пегилирование форм вариантов также приводит к улучшению фармакокинетики по сравнению с не пегилированными формами. Таким образом, в случае обоих измеренных компонентов PK, AUC и $t_{1/2}$, пегилирование приводит к улучшению значений PK по сравнению с не пегилированными формами.

Результаты также показывают, что пегилированные формы вариантов ADA2 также имеют улучшения в одном или обоих компонентах PK по сравнению с PEG-WT ADA2, хотя эти улучшения были больше для варианта PEG-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы), чем для PEG-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы). Например, для PEG-R23E (R20E согласно нумерации зрелой формы) AUC на 4271% выше (по сравнению с 4291% для PEG-WT ADA2) по сравнению с не пегилированной WT ADA2, и время полужизни на 1420% длиннее (по сравнению с 1078% для PEG-WT ADA2) по сравнению с не пегилированной WT ADA2. Наоборот, для PEG-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) AUC на 8187% больше (по сравнению с 4291% для PEG-WT ADA2) по сравнению с не пегилированной WT ADA2, и время полужизни на 1791% длиннее (по сравнению с 1078% для PEG-WT ADA2) по сравнению с не пегилированной WT ADA2.

Таблица 28. Сравнение общей экспозиции – Площадь под кривой (AUC): пегилированная ADA2 WT и HBP варианты

Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	AUC (мЕд*ч)/мл	Процентное увеличение AUC по сравнению с WT ADA2
WT ADA2	WT ADA2	32883	---
PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	1444000	4291
PEG-R23E	PEG-R20E	1437333	4271
PEG-K374D	PEG-K371D	2725000	8187

Таблица 29. Сравнение времени полужизни ($t_{1/2}$): пегилированная ADA2 WT и HBP варианты			
Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	Время полужизни ($t_{1/2}$) (мин)	Процентное увеличение $t_{1/2}$ по сравнению с WT ADA2
WT ADA2	WT ADA2	69	---
PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	813	1078
PEG-R23E	PEG-R20E	1049	1420
PEG-K374D	PEG-K371D	1305	1791

ПРИМЕР 10

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВАРИАНТОВ ADA2 С МОДИФИКАЦИЕЙ В АКТИВНОМ САЙТЕ, ОБЛАДАЮЩИХ УВЕЛИЧЕННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Активность аденозиндезаминазы выбранных вариантов-кандидатов, описанных в таблице 8 выше, содержащих аминокислотную замену в остатке, который участвует в ферментативной активности, оценивали, используя способ, описанный в Примере 4. В таблице 30 перечислены варианты, которые были протестированы. Для проведения экспериментов очищенная rHuADA2 WT и тестируемые варианты были получены в концентрации 5 мкг/мл, чтобы осуществить нормализацию на количество белка в каждом эксперименте.

Результаты анализа активности аденозиндезаминазы приведены в таблице 30 ниже. Указан процент (%) активности каждого варианта по сравнению с WT-ADA2. Результаты показывают, что активность всех протестированных вариантов, содержащих замену в положении 182 (положение 179 согласно нумерации зрелой формы), была значительно снижена, что указывает на то, что остаток глутаминовой кислоты (E) важен для ферментативной активности.

Наоборот, другие замены сохраняют ферментативную активность или обладают увеличенной ферментативной активностью. В частности, идентифицированные варианты с увеличенной активностью включают вариант R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы) со 170% активностью относительно WT, вариант H267Q (H264Q согласно нумерации зрелой формы) со 114% активностью относительно WT, H267G (H264G согласно нумерации зрелой формы) со 153% активностью относительно WT, R222K (R219K согласно

нумерации зрелой формы) со 152% активностью относительно WT, L224A (L221A согласно нумерации зрелой формы) со 128% активностью относительно WT, L224V (L221V согласно нумерации зрелой формы) со 123% активностью относительно WT, L224G (L221G согласно нумерации зрелой формы) со 113% активностью относительно WT и S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы) со 211% активностью относительно WT.

Таблица 30. Активность аденозиндезаминазы вариантов rHuADA2 с улучшенной активностью

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	ΔA/мин	мЕд/мл	std	% от активности WT
H267A	H264A	30,8	70,9	8,6	91
H267Q	H264Q	38,8	89,3	16,2	114
H267N	H264N	21,9	50,4	8	65
H267G	H264G	51,8	119,1	10,9	153
R222K	R219K	51,5	118,5	6,9	152
R222Q	R219Q	57,8	132,9	11,6	170
R222N	R219N	35,4	81,5	10,7	104
R222A	R219A	13,6	31,2	5,7	40
L224A	L221A	43,5	100,1	10,9	128
L224V	L221V	41,8	96,1	13,3	123
L224G	L221G	38,3	88,2	1,6	113
E182D	E179D	7,8	18,1	2,1	23
E182A	E179A	3,7	8,6	0,8	11
E182S	E179S	4,1	9,5	0,1	12
E182T	E179T	2,7	6,2	0,2	8
E182V	E179V	3,5	8	0,7	10
E182G	E179G	3	6,9	0,7	9
S265A	S262A	20,5	47,1	2,5	60
S265V	S262V	28,8	66,1	6,8	85
S265M	S262M	35,5	81,6	3,4	105
S265N	S262N	71,7	164,8	21,4	211
WT ADA2	WT ADA2	33,9	78	1,2	100

ПРИМЕР 11

СОЗДАНИЕ КОМБИНАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ

Были созданы комбинационные варианты, содержащие аминокислотную замену (аминокислотные замены), которая приводит к увеличению

ферментативной активности и ослаблению связывания с гепарином. В частности, аминокислотная замена S265N и/или R222Q (S262N и/или R219Q, согласно нумерации зрелой формы), которые приводили к самому большому увеличению ферментативной активности, как описано в Примере 10, комбинировали с одной или несколькими аминокислотными заменами K374D, K374E и/или R23E (K371D, K371E и/или R20E, соответственно, согласно нумерации зрелой формы), идентифицированными в Примере 7. Варианты были созданы, как описано выше в Примере 1 с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange Lightning Multi. Созданные комбинационные варианты приведены в таблице 31. Кинетические параметры активности аденозиндезаминазы и связывание с гепарином оценивали для комбинационных вариантов и соответствующих одноаминокислотных замен.

Таблица 31. Комбинационные варианты с модификациями в активном сайте и ослабленным связыванием с гепарином

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
S265N/K374D	S262N/K371D	59
S265N/K374E	S262N/K371E	60
S265N/R23E	S262N/R20E	61
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	62
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	63
R222Q/K374E	R219Q/K371E	263
R222Q/K374D	R219Q/K371D	264
R222Q/R23E	R219Q/R20E	265
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	266
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	267
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	268
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	269
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	270
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	271
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	272
R222Q/S265N	R219Q/S262N	273

Кинетические параметры активности аденозиндезаминазы оценивали для комбинационных вариантов, содержащих мутации S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы), приведенных в SEQ ID NO: 59-63, и/или R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы), приведенных в SEQ ID NO:263-273, и соответствующих одноаминокислотных замен. Активность связывания с гепарином оценивали для комбинационных вариантов, содержащих мутацию

S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы), приведенных в SEQ ID NO: 59-63 и соответствующих одноаминокислотных замен.

A. Кинетическая оценка активности аденозиндезаминазы

1. Способ анализа

Активность аденозиндезаминазы определяли путем измерения аммония, высвобождающегося из аденозина при превращении в инозин. Аммоний измеряли, используя коммерчески доступный набор для анализа аммония (номер по каталогу AA0100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Набор включает сухие реагенты, содержащие α-кетоглутаровую кислоту и NADPH, которые были восстановлены 5 мл воды перед использованием для анализа. Аммоний реагирует с α-кетоглутаровой кислотой (KGA) и восстанавливает никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) в присутствии L-глутамат дегидрогеназы (GDH). Уменьшение поглощения при 340 нМ из-за окисления NADPH пропорционально концентрации аммония и, следовательно, активности аденозиндезаминазы.

Кинетические параметры rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2 сравнивали, используя этот анализ при разных концентрациях аденозина и при pH 7,6 и 6,5. Использовали концентрации аденозина в диапазоне от 20 мкМ до 20 мМ. Был приготовлен субмолярный исходный раствор аденозина в 1 н. NaOH.

Для ферментативного анализа при pH 7,6 аденозин последовательно разбавляли 100 мМ ацетатом натрия (NaOAc), pH 4,9. Готовили 2х реакционную смесь, содержащую восстановленный реагент для анализа аммония (содержащий примерно 4 мМ α-кетоглутарата и примерно 300 мкМ NADPH), rHuADA2 WT или варианты в концентрации 1 мкг/мл (17 нМ) и глутаматдегидрогеназу (GDH, разведение 1:50). 85 мкл аденозина добавляли к 85 мкл 2х смеси в двух повторах в прозрачном для ультрафиолетовых лучей планшете с половинным объемом лунок. Измеряли изменения в поглощении (ΔA) при 340 нМ с течением времени при комнатной температуре.

Для ферментативного анализа при pH 6,5 аденозин последовательно разбавляли 200 мМ пиперазин-N,N′-бис(2-этансульфоновой кислотой) (PIPES), pH 6,5. Готовили 2х реакционную смесь в 200 мМ PIPES, pH 6,5, содержащую 4 мМ α-кетоглутарат, 300 мкМ NADPH, 1 мкг/мл (17 нМ) rHuADA2 или вариантов и 50 Ед/мл GDH (номер по каталогу G2626, Sigma-Aldrich). Ферментативную реакцию

инициировали добавлением равного объема аденозина к 2х смеси в прозрачный для ультрафиолетовых лучей планшет с половинным объемом лунок, как описано выше, и измеряли изменение в поглощении (ΔA) при 340 нМ с течением времени при комнатной температуре.

Активность аденозиндезаминазы в мЕд/мл (эквивалентно мкМ/мин) рассчитывали по следующей формуле:

1 мЕд/мл = -(-ΔA/мин x T_v) / (S_v x ε x l)

где T_v = общий объем (170 мкл), S_v = объем образца (85 мкл), ε = 6,22 x 10^{-3} мкМ$^{-1}$см$^{-1}$, l = 1 см.

Данные об активности были проанализированы с использованием нелинейной регрессии уравнения Михаэлиса-Ментен с помощью программного обеспечения Graphpad Prism для получений значений K_m и V_{max}. Также определяли другие кинетические параметры, такие как k_{cat} и k_{cat}/K_m.

k_{cat} (1/с) = $V_{max}/[E]_0$

V_{max} единиц = мкМ/мин

$[E]_0$ = 8,5 нМ или 0,0085 мкМ

k_{cat} = V_{max}/0,0085/60

k_{cat}/K_m единиц = 1/М*с

2. Результаты

В таблицах 32 и 33 приведены кинетические параметры для rHuADA2 дикого типа и вариантов rHuADA2 при pH 7,6 и pH 6,5, соответственно. K_m для rHuADA2 WT составила 5,25 мМ при pH 7,6 и 3,66 мМ при pH 6,5, и каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) rHuADA2 WT составила 9753 при pH 7,6 и 17060 при pH 6,5. Таким образом, эти результаты показывают, что rHuADA2 WT обладает более высокой активностью при pH 6,5. Все протестированные варианты обладают улучшенной ферментативной кинетикой по сравнению с WT-ADA2. В целом, улучшение ферментативной кинетики для разработанных вариантов заметнее при pH 6,5, чем при pH 7,6.

Например, S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы) имеет значительно улучшенные кинетические свойства по сравнению с WT. Замена остатка серина 265 (262 согласно нумерации зрелой формы) на аспарагин в

активном сайте rHuADA2 приводит к снижению значения K_m до 3,02 мМ при pH 7,6 и 1,49 мМ при pH 6,5, и увеличению каталитической активности (k_{cat}/K_m) с 9753 до 52208 (1/M*c) при pH 7,6, и с 17060 до 60339 (1/M*c) при pH 6,5. R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы) также имеет значительно улучшенные кинетические свойства по сравнению с WT. Замена остатка лизина 222 (219 согласно нумерации зрелой формы) на глутамин приводит к снижению значения K_m до 1,92 мМ при pH 7,6 и 0,994 мМ при pH 6,5, и увеличению каталитической активности (k_{cat}/K_m) с 9753 до 60697 (1/M*c) при pH 7,6, и с 17060 до 83146 (1/M*c) при pH 6,5.

Варианты ADA2 с K374D, K374E и R23E согласно нумерации по Zavialov (K371D, K371E и R20E, соответственно, согласно нумерации зрелой формы), идентифицированные как обладающие пониженным связыванием с гепарином, также обладали улучшенными кинетическими свойствами по сравнению с WT, которые были больше при pH 6,5. Комбинационные варианты, содержащие S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы), также обладали улучшенной каталитической активностью по сравнению с WT. В частности, для комбинационных вариантов S265N/K374E, S265N/R23E и S265N/R23E/K374E наблюдалось самое заметное улучшение в каталитической активности при pH 6,5 среди всех протестированных вариантов.

Результаты также показывают, что комбинационные варианты, содержащие R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы), имеют значительно улучшенные кинетические свойства по сравнению с WT ADA2 и R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы). Среди протестированных комбинационных вариантов ADA2 двойной мутант R222Q/S265N (R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы) имел самое заметное улучшение кинетических параметров, при этом K_m была в 4,7 раза ниже, а каталитическая эффективность в 15 раз выше (k_{cat}/K_m) при pH 7,6, и K_m была в 5 раза ниже, а каталитическая эффективность в 8,2 раза выше (k_{cat}/K_m) при pH 6,5 по сравнению с WT ADA2. Результаты также показывают, что для ADA2 WT и всех протестированных вариантов, содержащих R222Q (R219Q согласно нумерации зрелой формы), K_m меньше при pH 6,5, чем при pH 7,6.

Таблица 32. Кинетические параметры ADA2 WT и вариантов при pH 7,6; [E] = 8,5 нМ

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Vmax (мкМ/ мин)	K_m (мМ)	k_{cat} (1/с)	k_{cat}/K_m (1/М*с)
WT	WT	26,09	5,25	51,16	9753
K374D	K371D	28,25	4,88	55,39	11349
K374E	K371E	35,13	4,77	68,88	14438
R23E	R20E	29,08	5,06	57,02	11275
S265N	S262N	80,49	3,02	157,82	52208
R222Q	R219Q	59,28	1,92	116,24	60697
S265N/K374D	S262N/K371D	78,29	2,86	153,51	53637
S265N/K374E	S262N/K371E	87,44	2,54	171,45	67554
S265N/R23E	S262N/R20E	63,13	2,9	123,78	42743
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	72,78	3,13	142,71	45564
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	82,38	2,87	161,53	56262
R222Q/K374E	R219Q/K371E	87,27	1,58	171,12	108508
R222Q/K374D	R219Q/K371D	77,01	1,71	151,00	88252
R222Q/R23E	R219Q/R20E	84,71	1,46	166,10	114078
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	78,42	1,92	153,76	80086
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	88,43	1,34	173,39	129687
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	65,43	1,35	128,29	95103
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	70,96	1,19	139,14	117218
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	67,24	1,29	131,84	102602
R222Q/S265N/K374E /R23E	R219Q/S262N/K371E /R20E	90,91	1,24	178,25	143407
R222Q/S265N/K374D /R23E	R219Q/S262N/K371D /R20E	72,58	1,23	142,31	115514
R222Q/S265N	R219Q/S262N	87,79	1,10	172,14	157203

Таблица 33. Кинетические параметры ADA2 WT и вариантов при pH 6,5; [E] = 8,5 нМ

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Vmax (мкМ/ мин)	K_m (мМ)	k_{cat} (1/с)	k_{cat}/K_m (1/М*с)
WT	WT	31,81	3,66	62,37	17060
K374D	K371D	42,98	3,16	84,27	26635
K374E	K371E	41,93	3,18	82,22	25895
R23E	R20E	37,16	3,29	72,86	22167
S265N	S262N	45,79	1,49	89,78	60339
R222Q	R219Q	42,15	0,994	82,65	83146
S265N/K374D	S262N/K371D	43,85	1,51	85,98	56978
S265N/K374E	S262N/K371E	57,13	1,41	112,02	79390
S265N/R23E	S262N/R20E	53,25	1,43	104,41	72812
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	43,42	1,50	85,14	56948
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	63,74	1,29	124,98	96585
R222Q/K374E	R219Q/K371E	58,56	0,99	114,82	115937
R222Q/K374D	R219Q/K371D	60,87	0,79	119,35	150584
R222Q/R23E	R219Q/R20E	60,47	0,84	118,57	141778
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	54,48	0,86	106,82	124474
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	60,68	0,67	118,98	177795
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	45,53	0,80	89,27	111985
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	50,89	0,76	99,78	131054
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	40,59	1,01	79,59	79192
R222Q/S265N/K374E /R23E	R219Q/S262N/K371E /R20E	54,82	0,77	107,49	140199
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	45,78	0,81	89,76	111150

Таблица 33. Кинетические параметры ADA2 WT и вариантов при pH 6,5; [E] = 8,5 нМ					
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Vmax (мкМ/ мин)	K_m (мМ)	k_{cat} (1/с)	k_{cat}/K_m (1/М*с)
/R23E	/R20E				
R222Q/S265N	R219Q/S262N	56,75	0,80	111,27	139775

B. Связывание с гепарином комбинационных вариантов

Активность связывания с гепарином для точечных мутантов и комбинационных вариантов, содержащих S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы), оценивали, используя анализ связывания с гепарином, основанный на ELISA, описанный в Примере 7.A выше. Результаты приведены в таблице 34. Результаты подтверждают, что варианты K374D, K374E и R23E обладают ослабленным связыванием с гепарином по сравнению с WT-ADA2. Кроме того, вариант S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы), созданный для улучшения ферментативной активности путем модификации остатка активного сайта, также обладает ослабленным связыванием с планшетами, покрытыми гепарином, что свидетельствует о том, что модификации активного сайта фермента могут влиять на связывание с гепарином аллостерическим образом. Также, все из протестированных комбинационных вариантов показали значительное уменьшение в связывании с гепарином, что свидетельствует о том, что могут быть созданы комбинации вариантов, обладающие улучшенной ферментативной активностью в отношении аденозина и ослабленным связыванием с гепарином.

Таблица 34. Анализ связывания с гепарином ADA2 WT и комбинационных вариантов методом ELISA			
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	ELISA анализ связывания с гепарином Средняя OD_{450}	stdev.
K374D	K371D	0,87	0,03
K374E	K371E	0,03	0,01
R23E	R20E	0,71	0,04
S265N	S262N	0,88	0,19
S265N/K374D	S262N/K371D	0,92	0,13
S265N/K374E	S262N/K371E	0,6	0,12
S265N/R23E	S262N/R20E	1,03	0,02
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	0,69	0,07
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	0,93	0,11
WT ADA2	WT ADA2	2,31	0,01
WT ADA1	WT ADA1	-0,02	0

ПРИМЕР 12

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ rHuADA2 WT И ВАРИАНТОВ rHuADA2

Стабильность rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2 измеряли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) при повышении температуры. В DSF измеряется конформационная стабильность, которая коррелирует с термической стабильностью. Температура плавления (Tm) в DSF определяется в средней точке на графике конформационного перехода (разворачивания) белка.

Не пегилированная rHuADA2 WT, не пегилированные варианты rHuADA2 и пегилированные формы rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2 были получены в концентрациях 0,1-1 мг/мл и смешаны с красителем теплового сдвига белков ROX™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; номер по каталогу 4461146) до финальной концентрации красителя, которая соответствует разведению исходного раствора ROX™ в 125 раз. Образцы белка далее нанесли в 96-луночный планшет в объеме 20 мкл/лунку в трех повторах. Систему ViiA7 RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) использовали для измерения сдвига во флуоресценции при увеличении температуры образцов. Стадии реакции были следующие: инкубация при 25°C в течение 2 мин; изменение температуры от 25 до 99°C со скоростью 0,05°C в секунду; с последующей инкубацией при 99°C в течение 2 мин. Длины волн, используемые для регистрации эмиссии и возбуждения, составляли 623 нанометра (нм) и 580 нМ, соответственно.

В таблице 35 приведены значения температуры плавления (Tm), определенные с помощью DSF анализа. Результаты показывают, что Tm варианта K374E (K371E согласно нумерации зрелой формы) на 1,4°C выше, чем WT ADA2, что свидетельствует об улучшении термостабильности варианта. Для других протестированных вариантов Tm была несколько ниже или сопоставима с Tm WT ADA2. Результаты показывают, что все пегилированные формы обладали более высокой Tm по сравнению с соответствующей не пегилированной формой, что также свидетельствует о том, что пегилирование улучшает термостабильность ферментов.

Таблица 35. Температура плавления (Tm) ADA2 WT, вариантов и пегилированных форм

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Tm (°C)
WT ADA2	WT ADA2	67,1
K374D	K371D	66,8
K374E	K371E	69,7
R23E	R20E	65,2
S265N	S262N	60,8
S265N/K374D	S262N/K371D	60,8
S265N/K374E	S262N/K371E	61,3
S265N/R23E	S262N/R20E	59,6
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	59,8
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	60,4
PEG-WT ADA2	PEG-WT ADA2	68,81
PEG-K374D	PEG-K371D	67,81
PEG-R23E	PEG-R20E	66,4

ПРИМЕР 13

ОПТИМУМ pH ДЛЯ rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2

Активность аденозиндезаминазы rHuADA2 и ее вариантов при различных pH оценивали для определения оптимума pH для каждого белка. Активность аденозиндезаминазы определяли спектрофотометрически прямым измерением изменений в поглощении аденозина. УФ-спектры поглощения аденозина (ADO) и инозина (INO) очень похожи и сильно перекрываются, при этом соответствующие пики поглощения приходятся на 261 нМ и 249 нМ. В ходе реакции дезаминирования поглощение ADO уменьшается, тогда как поглощение INO увеличивается с течением времени. Поскольку из-за динамических изменений в поглощении сложно осуществлять мониторинг активности на одной длине волны, определяли относительную активность ADO как отношение пика ADO к изобестической точке (т.е., длина, на которой ADO и INO имеют одинаковый коэффициент экстинкции). Изобестическая точка, которая составляет 253 нМ, остается постоянной и не зависит от концентрации, поэтому она является контрольной точкой для коррекции несоответствий объема или интенсивности. Поэтому изменения в концентрации аденозина и, следовательно, активность аденозиндезаминазы, оценивали как соотношение поглощение при 261 нМ/поглощение при 253 нМ (A_{261}/A_{253}), основываясь на стандартной кривой.

А. Стандартная кривая

Для построения стандартной кривой для ADO и INO готовили серии смесей растворов в 0,001% Tween-20, содержащих разные концентрации ADO и INO. Общая концентрация смеси ADO и INO составила 50 мкМ, в 1x PBS (10 мМ фосфат, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl), pH 7,4. Образцы измеряли в диапазоне длин волн между 220 нМ и 300 нМ, чтобы определить изобестическую точку, в которой все спектры пересекаются. В таблице 36 приведены измерения, используемые для построения стандартной кривой. Строили зависимость отношения A_{261}/A_{253} от концентрации ADO и в результате линейной аппроксимации получали стандартную кривую $A_{261}/A_{253} = 0,0249[ADO] - 0,0152$ ($R^2 = 0,999$).

Таблица 36. Стандартная кривая для спектрофотометрического определения концентрации аденозина

[ADO] (мкМ)	A_{261}	A_{253}	A_{261}/A_{253}
50	0,669	0,5455	1,2264
49,5	0,6543	0,5366	1,2193
49	0,6493	0,5388	1,2051
48,5	0,6418	0,5378	1,1934
48	0,6352	0,5386	1,1794
47,5	0,6306	0,5406	1,1665
47	0,6244	0,5406	1,1550
46,5	0,6134	0,5363	1,1438
46	0,6108	0,5402	1,1307
45,5	0,6026	0,5395	1,1170
45	0,5965	0,5404	1,1038

B. Спектрофотометрический анализ активности аденозиндезаминазы

Для проведения спектрофотометрического анализа аденозиндезаминазы ADA2 и вариантов, готовили 2x раствор, содержащий 10 мМ ADO в 100 мМ калий-фосфатного буфера (KPB), 0,1% Tween-20 при разных pH (т.е., 5.5, 6, 6.5, 6,75, 7, 7,25, 7,4, 7,75 и 8). Готовили отдельный 2x раствор, содержащий 2 мкг/мл rHuADA2 WT или ее вариантов, в том же самом 100 мМ калий-фосфатном буфере (KPB), 0,1% Tween-20 при соответствующем pH (т.е., 5.5, 6, 6.5, 6,75, 7, 7,25, 7,4, 7,75 и 8). Равные объемы раствора ADO и раствора ADA2 (дикий тип или варианты) смешивали для инициации реакции. В каждый момент времени (т.е., 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15 мин), отбирали небольшую аликвоту (4 мкл) и разбавляли ее в 50 раз добавлением к 196 мкл 1x PBS, pH 7,4.

Разбавленные образцы далее разбавляли в 2 раза (в двух повторах) добавлением 85 мкл образцов к 85 мкл 1x PBS в прозрачном для ультрафиолетовых лучей планшете с половинным объемом лунок. Поглощение при 253 нМ и 261 нМ измеряли для каждого разбавленного образца.

Концентрацию аденозина определяли, используя отношение A_{261}/A_{253} и стандартную кривую. Активность аденозиндезаминазы измеряли по отрицательному изменению концентрации ADO в мин x 100.

В таблице 37 приведены результаты активности аденозиндезаминазы, измеренной спектрофотометрическим способом, при различных pH. Результаты показывают, что оптимальный pH (наиболее высокая активность дезаминазы) для активности rHuADA2 WT приблизительно составляет 6,5. Варианты ADA2 K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) и K374E (K371E согласно нумерации зрелой формы) имеют аналогичный профиль активности в зависимости от pH, как и rHuADA2 WT.

Наоборот, вариант ADA2 S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы) имеет оптимум pH при более высоком pH 7,25. Двойные и тройные варианты, содержащие мутацию S265N (S262N согласно нумерации зрелой формы) также имеют схожий оптимум pH при 7,25.

Таблица 37. Активность аденозиндезаминазы ADA2 и вариантов при различных pH

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Активность аденозиндезаминазы Δ [ADO]/мин x (-100) при pH								
		5,5	6	6,5	6,75	7	7,25	7,4	7,75	8
WT ADA2	WT ADA2	21,11	22,06	33,77	29,76	28,70	24,47	21,77	6,65	3,58
K374D	K371D	12,19	10,68	14,22	12,90	13,22	12,86	10,55	1,55	3,46
K374E	K371E	15,76	19,15	27,09	25,72	24,63	21,88	18,32	5,98	4,25
R23E	R20E	22,84	25,64	29,18	29,47	28,53	21,71	19,37	7,41	5,33
S265N	S262N	24,61	31,59	41,30	44,46	45,16	50,99	45,81	25,16	3,70
S265N/K374D	S262N/K371D	22,89	33,51	39,06	41,58	45,98	42,69	43,37	22,29	4,36
S265N/K374E	S262N/K371E	31,84	44,31	50,23	54,55	59,68	60,07	57,15	28,28	1,77
S265N/R23E	S262N/R20E	27,34	38,26	45,58	48,49	51,90	56,12	50,44	24,42	4,63
S265N/R23E/ K374D	S262N/R20E/ K371D	20,27	28,16	35,51	33,24	40,08	42,28	34,66	18,46	4,94
S265N/R23E/ K374E	S262N/R20E/ K371E	37,94	52,70	66,08	67,95	74,68	77,81	67,77	35,97	2,04

ПРИМЕР 14

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ КОМБИНАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ ПЕГИЛИРОВАННОЙ rHuADA2 *IN VIVO*

Фармакокинетику (PK) пегилированного варианта ADA2-K374D, пегилированного варианта ADA2-R222Q/S265N и пегилированного варианта

ADA2-R222Q/S265N/K374D согласно нумерации по Zavialov (K371D, R219Q/S262N и R219Q/S262N/K371D, соответственно, согласно нумерации зрелой формы) анализировали в иммунокомпетентной мышиной модели.

A. План исследования

Двадцать семь (27) самцов мышей BALB/c разделяли на три (3) группы дозирования, и далее разделяли еще на три (3) группы, каждая предназначена для отбора крови в разные моменты времени. Таким образом, мышей случайным образом распределяли суммарно на девять (9) групп. Мышей взвешивали до начала исследования и случайным образом распределяли на 9 групп на основе их массы тела. В каждой группе три группы мышей (3) использовали для дозирования каждого тестируемого препарата, чтобы предотвратить избыточный забор крови у животного. Для измерения начальных уровней ADA2 образец крови отбирали е 12 случайным образом выбранных мышей, и плазму крови получали, используя в качестве антикоагулянта калиевую соль (K_3) этилендиаминтетрауксусной кислоты (K_3-EDTA). Кровь отбирали путем прокола поднижнечелюстной вены.

Каждой мыши путем внутривенной инъекции в хвостовую вену вводили дозу 3 мг/кг одного из трех тестируемых препаратов пегилированного варианта ADA2, приведенных в таблице 38, т.е., PEG-rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы), PEG-rHuADA2-R222Q/S265N (R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы) или PEG-rHuADA2-R222Q/S265N/K374D (R219Q/S262N/K371D согласно нумерации зрелой формы). Пегилированные вариантs ADA2 были получены способом пегилирования, описанным в Примере 8.A, с небольшими модификациями. Кратко, все варианты ADA2 в концентрации 10 мг/мл пегилировали линейным PEG-20K (JenKem Technology, Plano, TX; номер по каталогу M-SCM-20K) в молярном отношении 1:15 и инкубировали сначала при 37° в течение 30 мин, далее при 4°C в течение 16 часов. Результаты SDS-PAGE и аналитической SEC показывают, что 100% вариантов ADA2 были пегилированы в оптимизированных условиях пегилирования и все пегилированные варианты ADA2 сохраняли 100% ферментативной активности.

Приблизительно 200 мкл цельной крови отбирали в определенные моменты времени от соответствующих групп мышей, как указано ниже в таблице 38, и держали на льду до получения плазмы. Первые два (2) образца крови отбирали путем прокола поднижнечелюстной вены. Финальный образец отбирали из терминальной крови. Плазму получали центрифугированием крови (500 x g в течение 5 мин при 4°C), далее переносили плазму в чистую пробирку и сразу замораживали при -80°C до проведения анализа на активность аденозиндезаминазы. Активность аденозиндезаминазы определяли, как описано в Примере 4.

Некомпартментный анализ (NCA) проводили, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin версии 6.3 (Pharsight Corp, St. Louis, MO 63101). Рассчитывали время полужизни, или время, необходимое для снижения активности белков ADA2 в два раза. Также измеряли общую экспозицию, рассчитывая площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC). Значения AUC и времени полужизни получали из невзвешенного среднего значения для каждой группы, получающей тестируемые препараты. Для анализа данных использовали следующие опции в программе Phoenix WinNonlin: (i) линейная трапецевидная/линейная интерполяция для AUC; (ii) наклон кривой в конечной стадии подбирается по методу наилучшего приближения; и (iii) одинаковое взвешивание данных.

Таблица 38. План фармакокинетического исследования пегилированной ADA2 WT и ее вариантов

Группа #	Тестируемый препарат		Число животных	Доза	Временные точки сбора крови после введения дозы (часы)
	(нумерация по Zavialov)	(нумерация зрелой формы)			
1	PEG-K374D	PEG-K371D	3	3 мг/кг	0.25, 8, 48
2			3		1, 4, 72
3			3		2, 24, 168
4	PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	3	3 мг/кг	0.25, 8, 48
5			3		1, 4, 72
6			3		2, 24, 168
7	PEG-R222Q/S265N/K374D	PEG-R219Q/S262N/K371D	3	3 мг/кг	0.25, 8, 48
8			3		1, 4, 72

Таблица 38. План фармакокинетического исследования пегилированной ADA2 WT и ее вариантов					
Группа #	Тестируемый препарат		Число животных	Доза	Временные точки сбора крови после введения дозы (часы)
	(нумерация по Zavialov)	(нумерация зрелой формы)			
9			3		2, 24, 168

B. Результаты

1. Фармакокинетика не пегилированной rHuADA2 WT и вариантов rHuADA2

Фармакокинетические (PK) свойства пегилированных вариантов ADA2 PEG-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы), PEG-R222Q/S265N (R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы) и PEG-R222Q/S265N/K374D (R219Q/S262N/K371D согласно нумерации зрелой формы) приведены в таблицах 39 и 40. В таблице 39 приведена общая экспозиция, рассчитанная по площади под кривой (AUC), и в таблице 40 приведено время полужизни ($t_{1/2}$) тестируемых пегилированных вариантов rHuADA2.

Результаты показывают, что пегилирование значительно улучшает фармакокинетические профили ADA2 и для всех протестированных пегилированных вариантов ADA2 значения AUC значительно выше, а время полужизни длиннее, чем для не пегилированной rHuADA2 WT (*см.* Пример 9 и таблицы 26 и 27). Для PEG-R222Q/S265N (R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы) наблюдаются значительные улучшения, так AUC на 49661% выше, чем для не пегилированной rHuADA2 WT, а время полужизни на 4043% длиннее, чем для не пегилированной rHuADA2 WT. Для PEG-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) показано значительное улучшение PK свойств по сравнению с группой, получающей такой же тестируемый препарат, в Примере 9 и таблицах 26 и 27, что может быть следствием оптимизации условий пегилирования, используемых при приготовлении тестируемых препаратов.

Таблица 39. Сравнение общей экспозиции – площадь под кривой (AUC): комбинационные варианты пегилированной ADA2

Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	AUC (Ед*ч)/мл	Процентное увеличение AUC по сравнению с WT ADA2
PEG-K374D	PEG-K371D	4662	14177
PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	16330	49,661
PEG-K374D/R222Q/S265N	PEG-K371D/R219Q/S262N	9340	28404

Таблица 40. Сравнение времени полужизни ($t_{1/2}$): пегилированные варианты ADA2

Тестируемый препарат (нумерация по Zavialov)	Тестируемый препарат (нумерация зрелой формы)	Время полужизни ($t_{1/2}$) (мин)	Процентное увеличение $t_{1/2}$ по сравнению с WT ADA2
PEG-K374D	PEG-K371D	2256	3269
PEG-R222Q/S265N	PEG-R219Q/S262N	2790	4043
PEG-K374D/R222Q/S265N	PEG-K371D/R219Q/S262N	2364	3426

ПРИМЕР 15

СОЗДАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ КОМБИНАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ

Были созданы дополнительные комбинации вариантов, сочетающие аминокислотную замену (аминокислотные замены), которые увеличивают ферментативную активность, и/или аминокислотную замену (аминокислотные замены), которая приводит к ослабленному связыванию с гепарином, с другими модификациями, такими как делеции/вставки/замены и аминокислотная замена (аминокислотные замены), которые приводят к другим измененным активностям. В частности, аминокислотная замена S265N и/или R222Q (S262N и/или R219Q, согласно нумерации зрелой формы), которая приводит к значительному увеличению ферментативной активности, как описано в Примере 10, была комбинирована с другими модификациями ADA2, описанными в предыдущих Примерах. Аминокислотная замена K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) также была комбинирована с другими модификациями ADA2, описанными в предыдущих Примерах. Комбинационные варианты приведены в таблице 41.

Таблица 41. Другие комбинационные варианты

Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	589

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	590
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	591
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	592
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	593
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	594
R222Q/S265N/---→N4/---→A5/---→S6	R219Q/S262N/---→N1/---→A2/---→S3	596
R222Q/S265N/R23N/V25S	R219Q/S262N/R20N/V22S	597
R222Q/S265N/K374N/D376S	R219Q/S262N/K371N/D373S	598
R222Q/S265N/K375N/I377S	R219Q/S262N/K372N/I374S	599
R222Q/S265N/T406N/H408S	R219Q/S262N/T403N/H405S	600
R222Q/S265N/G407N/P409S	R219Q/S262N/G404N/P406S	601
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{15}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{15}$	602
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	603
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_7$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_7$	604
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_5$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_5$	605
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_3$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_3$	606
R222Q/S265N/R128N/P129A	R219Q/S262N/R125N/P126A	607
R222Q/S265N/S130N/K132S	R219Q/S262N/S127N/K129S	608
R222Q/S265N/P129N/E131T	R219Q/S262N/P126N/E128T	609
R222Q/S265N/R115N/I117T	R219Q/S262N/R112N/I114T	610
R222Q/S265N/I137N/L138C/L139T	R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T	611
R222Q/S265N/I137N/L138S/L139T	R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T	612
R222Q/S265N/R145N/Q147S	R219Q/S262N/R142N/Q144S	613
R222Q/S265N/E140N/Y142T	R219Q/S262N/E137N/Y139T	614
R222Q/S265N/P114N/G116S	R219Q/S262N/P111N/G113S	615
R222Q/S265N/F122S	R219Q/S262N/F119S	616
R222Q/S265N/F122K	R219Q/S262N/F119K	617
R222Q/S265N/Y227R	R219Q/S262N/Y224R	618
R222Q/S265N/Y227N	R219Q/S262N/Y224N	619
R222Q/S265N/Y194S	R219Q/S262N/Y191S	620
R222Q/S265N/Y194D	R219Q/S262N/Y191D	621
R222Q/S265N/F186K	R219Q/S262N/F183K	622
R222Q/S265N/Y194D/Y227R	R219Q/S262N/Y191D/Y224R	623
R222Q/S265N/F112S	R219Q/S262N/F109S	624
R222Q/S265N/F112A	R219Q/S262N/F109A	625
R222Q/S265N/R121D	R219Q/S262N/R118D	626
R222Q/S265N/R121A	R219Q/S262N/R118A	627
R222Q/S265N/Y142T	R219Q/S262N/Y139T	628
R222Q/S265N/Y142A	R219Q/S262N/Y139A	629
R222Q/S265N/W136S	R219Q/S262N/W133S	630
R222Q/S265N/W136T	R219Q/S262N/W133T	631
R222Q/S265N/P127A	R219Q/S262N/P124A	632
R222Q/S265N/P127S	R219Q/S262N/P124S	633
R222Q/S265N/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	634
R222Q/S265N/V102-	R219Q/S262N/V99-	635

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
Q147del→$(GGGGS)_2$	Q144del→$(GGGGS)_2$	
R222Q/S265N/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	636
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	637
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	638
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	639
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	640
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	641
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	642
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	643
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	644
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	645
K374D/C108-T150del→$(Gly)_{15}$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$	647
K374D/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	648
K374D/C108-T150del→$(Gly)_7$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$	649
K374D/C108-T150del→$(Gly)_5$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$	650
K374D/C108-T150del→$(Gly)_3$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$	651
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_{15}$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$	671
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	672
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_7$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$	673
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_5$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$	674
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_3$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$	675
R222Q/S265N/K14A	R219Q/S262N/K11A	659
R222Q/S265N/K14D	R219Q/S262N/K11D	660
R222Q/S265N/K14E	R219Q/S262N/K11E	661
R222Q/S265N/K16A	R219Q/S262N/K13A	662
R222Q/S265N/K16D	R219Q/S262N/K13D	663
R222Q/S265N/K16E	R219Q/S262N/K13E	682
R222Q/S265N/K374A	R219Q/S262N/K371A	683
R222Q/S265N/K375A	R219Q/S262N/K372A	684
R222Q/S265N/K375D	R219Q/S262N/K372D	685
R222Q/S265N/K375E	R219Q/S262N/K372E	686

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/K455A	R219Q/S262N/K452A	687
R222Q/S265N/K455D	R219Q/S262N/K452D	688
R222Q/S265N/K455E	R219Q/S262N/K452E	689
R222Q/S265N/R23A	R219Q/S262N/R20A	690
R222Q/S265N/R23D	R219Q/S262N/R20D	691
R222Q/S265N/R369A	R219Q/S262N/R366A	692
R222Q/S265N/R369D	R219Q/S262N/R366D	693
R222Q/S265N/R369E	R219Q/S262N/R366E	694
R222Q/S265N/H267A	R219Q/S262N/H264A	695
R222Q/S265N/H267Q	R219Q/S262N/H264Q	696
R222Q/S265N/H267N	R219Q/S262N/H264N	697
R222Q/S265N/H267G	R219Q/S262N/H264G	698
R222K/S265N	R219K/S262N	699
R222N/S265N	R219N/S262N	700
R222A/S265N	R219A/S262N	701
R222Q/S265N/L224A	R219Q/S262N/L221A	702
R222Q/S265N/L224V	R219Q/S262N/L221V	703
R222Q/S265N/L224G	R219Q/S262N/L221G	704
R222Q/S265N/E182D	R219Q/S262N/E179D	705
R222Q/S265N/E182A	R219Q/S262N/E179A	706
R222Q/S265N/E182S	R219Q/S262N/E179S	707
R222Q/S265N/E182T	R219Q/S262N/E179T	708
R222Q/S265N/E182V	R219Q/S262N/E179V	709
R222Q/S265N/E182G	R219Q/S262N/E179G	710
R222Q/S265A	R219Q/S262A	711
R222Q/S265V	R219Q/S262V	712
R222Q/S265M	R219Q/S262M	713
R222Q/S265N/K14A/R23A	R219Q/S262N/K11A/R20A	714
R222Q/S265N/K14A/R23A/K374A	R219Q/S262N/K11A/R20A/K371A	715
R222Q/S265N/R23A/K374A	R219Q/S262N/R20A/K371A	716
R222Q/S265N/K14A/K374A	R219Q/S262N/K11A/K371A	717
R222Q/S265N/K29A	R219Q/S262N/K26A	718
R222Q/S265N/K29D	R219Q/S262N/K26D	719
R222Q/S265N/K29E	R219Q/S262N/K26E	720
R222Q/S265N/R220A	R219Q/S262N/R217A	721
R222Q/S265N/R220D	R219Q/S262N/R217D	722
R222Q/S265N/R220E	R219Q/S262N/R217E	723
R222Q/S265N/K261A	R219Q/S262N/K258A	724
R222Q/S265N/K261D	R219Q/S262N/K258D	725
R222Q/S265N/K261E	R219Q/S262N/K258E	726
R222Q/S265N/R280A	R219Q/S262N/R277A	727
R222Q/S265N/R280D	R219Q/S262N/R277D	728
R222Q/S265N/R280E	R219Q/S262N/R277E	729
R222Q/S265N/R286A	R219Q/S262N/R283A	730
R222Q/S265N/R286D	R219Q/S262N/R283D	731
R222Q/S265N/R286E	R219Q/S262N/R283E	732

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/K312A	R219Q/S262N/K309A	733
R222Q/S265N/K312D	R219Q/S262N/K309D	734
R222Q/S265N/K312E	R219Q/S262N/K309E	735
R222Q/S265N/K320A	R219Q/S262N/K317A	736
R222Q/S265N/K320D	R219Q/S262N/K317D	737
R222Q/S265N/K320E	R219Q/S262N/K317E	738
R222Q/S265N/K324A	R219Q/S262N/K321A	739
R222Q/S265N/K324D	R219Q/S262N/K321D	740
R222Q/S265N/K324E	R219Q/S262N/K321E	741
R222Q/S265N/R355A	R219Q/S262N/R352A	742
R222Q/S265N/R355D	R219Q/S262N/R352D	743
R222Q/S265N/R355E	R219Q/S262N/R352E	744
R222Q/S265N/R444A	R219Q/S262N/R441A	745
R222Q/S265N/R444D	R219Q/S262N/R441D	746
R222Q/S265N/R444E	R219Q/S262N/R441E	747
R222Q/S265N/K447A	R219Q/S262N/K444A	748
R222Q/S265N/K447D	R219Q/S262N/K444D	749
R222Q/S265N/K447E	R219Q/S262N/K444E	750
R222Q/S265N/K464A	R219Q/S262N/K461A	751
R222Q/S265N/K464D	R219Q/S262N/K461D	752
R222Q/S265N/K464E	R219Q/S262N/K461E	753
R222Q/S265N/K472A	R219Q/S262N/K469A	754
R222Q/S265N/K472D	R219Q/S262N/K469D	755
R222Q/S265N/K472E	R219Q/S262N/K469E	756
R222Q/S265N/K473A	R219Q/S262N/K470A	757
R222Q/S265N/K473D	R219Q/S262N/K470D	758
R222Q/S265N/K473E	R219Q/S262N/K470E	759
R222Q/S265N/D89A	R219Q/S262N/D86A	760
R222Q/S265N/D89C	R219Q/S262N/D86C	761
R222Q/S265N/D89E	R219Q/S262N/D86E	762
R222Q/S265N/D89F	R219Q/S262N/D86F	763
R222Q/S265N/D89G	R219Q/S262N/D86G	764
R222Q/S265N/D89H	R219Q/S262N/D86H	765
R222Q/S265N/D89I	R219Q/S262N/D86I	766
R222Q/S265N/D89K	R219Q/S262N/D86K	767
R222Q/S265N/D89L	R219Q/S262N/D86L	768
R222Q/S265N/D89M	R219Q/S262N/D86M	769
R222Q/S265N/D89N	R219Q/S262N/D86N	770
R222Q/S265N/D89P	R219Q/S262N/D86P	771
R222Q/S265N/D89Q	R219Q/S262N/D86Q	772
R222Q/S265N/D89R	R219Q/S262N/D86R	773
R222Q/S265N/D89S	R219Q/S262N/D86S	774
R222Q/S265N/D89T	R219Q/S262N/D86T	775
R222Q/S265N/D89V	R219Q/S262N/D86V	776
R222Q/S265N/D89W	R219Q/S262N/D86W	777
R222Q/S265N/D89Y	R219Q/S262N/D86Y	778

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/E182C	R219Q/S262N/E179C	779
R222Q/S265N/E182F	R219Q/S262N/E179F	780
R222Q/S265N/E182H	R219Q/S262N/E179H	781
R222Q/S265N/E182I	R219Q/S262N/E179I	782
R222Q/S265N/E182K	R219Q/S262N/E179K	783
R222Q/S265N/E182L	R219Q/S262N/E179L	784
R222Q/S265N/E182M	R219Q/S262N/E179M	785
R222Q/S265N/E182N	R219Q/S262N/E179N	786
R222Q/S265N/E182P	R219Q/S262N/E179P	787
R222Q/S265N/E182Q	R219Q/S262N/E179Q	788
R222Q/S265N/E182R	R219Q/S262N/E179R	789
R222Q/S265N/E182W	R219Q/S262N/E179W	790
R222Q/S265N/E182Y	R219Q/S262N/E179Y	791
R222C/S265N	R219C/S262N	792
R222D/S265N	R219D/S262N	793
R222E/S265N	R219E/S262N	794
R222F/S265N	R219F/S262N	795
R222G/S265N	R219G/S262N	796
R222H/S265N	R219H/S262N	797
R222I/S265N	R219I/S262N	798
R222L/S265N	R219L/S262N	799
R222M/S265N	R219M/S262N	800
R222P/S265N	R219P/S262N	801
R222S/S265N	R219S/S262N	802
R222T/S265N	R219T/S262N	803
R222V/S265N	R219V/S262N	804
R222W/S265N	R219W/S262N	805
R222Y/S265N	R219Y/S262N	806
R222Q/S265N/L224C	R219Q/S262N/L221C	807
R222Q/S265N/L224D	R219Q/S262N/L221D	808
R222Q/S265N/L224E	R219Q/S262N/L221E	809
R222Q/S265N/L224F	R219Q/S262N/L221F	810
R222Q/S265N/L224H	R219Q/S262N/L221H	811
R222Q/S265N/L224I	R219Q/S262N/L221I	812
R222Q/S265N/L224K	R219Q/S262N/L221K	813
R222Q/S265N/L224M	R219Q/S262N/L221M	814
R222Q/S265N/L224N	R219Q/S262N/L221N	815
R222Q/S265N/L224P	R219Q/S262N/L221P	816
R222Q/S265N/L224Q	R219Q/S262N/L221Q	817
R222Q/S265N/L224R	R219Q/S262N/L221R	818
R222Q/S265N/L224S	R219Q/S262N/L221S	819
R222Q/S265N/L224T	R219Q/S262N/L221T	820
R222Q/S265N/L224W	R219Q/S262N/L221W	821
R222Q/S265N/L224Y	R219Q/S262N/L221Y	822
R222Q/S265C	R219Q/S262C	823
R222Q/S265D	R219Q/S262D	824

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R222Q/S265E	R219Q/S262E	825
R222Q/S265F	R219Q/S262F	826
R222Q/S265G	R219Q/S262G	827
R222Q/S265H	R219Q/S262H	828
R222Q/S265I	R219Q/S262I	829
R222Q/S265K	R219Q/S262K	830
R222Q/S265L	R219Q/S262L	831
R222Q/S265P	R219Q/S262P	832
R222Q/S265Q	R219Q/S262Q	833
R222Q/S265R	R219Q/S262R	834
R222Q/S265T	R219Q/S262T	835
R222Q/S265W	R219Q/S262W	836
R222Q/S265Y	R219Q/S262Y	837
R222Q/S265N/H267C	R219Q/S262N/H264C	838
R222Q/S265N/H267D	R219Q/S262N/H264D	839
R222Q/S265N/H267E	R219Q/S262N/H264E	840
R222Q/S265N/H267F	R219Q/S262N/H264F	841
R222Q/S265N/H267I	R219Q/S262N/H264I	842
R222Q/S265N/H267K	R219Q/S262N/H264K	843
R222Q/S265N/H267L	R219Q/S262N/H264L	844
R222Q/S265N/H267M	R219Q/S262N/H264M	845
R222Q/S265N/H267P	R219Q/S262N/H264P	846
R222Q/S265N/H267R	R219Q/S262N/H264R	847
R222Q/S265N/H267S	R219Q/S262N/H264S	848
R222Q/S265N/H267T	R219Q/S262N/H264T	849
R222Q/S265N/H267V	R219Q/S262N/H264V	850
R222Q/S265N/H267W	R219Q/S262N/H264W	851
R222Q/S265N/H267Y	R219Q/S262N/H264Y	852
R222Q/S265N/S269A	R219Q/S262N/S266A	853
R222Q/S265N/S269C	R219Q/S262N/S266C	854
R222Q/S265N/S269D	R219Q/S262N/S266D	855
R222Q/S265N/S269E	R219Q/S262N/S266E	856
R222Q/S265N/S269F	R219Q/S262N/S266F	857
R222Q/S265N/S269G	R219Q/S262N/S266G	858
R222Q/S265N/S269H	R219Q/S262N/S266H	859
R222Q/S265N/S269I	R219Q/S262N/S266I	860
R222Q/S265N/S269K	R219Q/S262N/S266K	861
R222Q/S265N/S269L	R219Q/S262N/S266L	862
R222Q/S265N/S269M	R219Q/S262N/S266M	863
R222Q/S265N/S269N	R219Q/S262N/S266N	864
R222Q/S265N/S269P	R219Q/S262N/S266P	865
R222Q/S265N/S269Q	R219Q/S262N/S266Q	866
R222Q/S265N/S269R	R219Q/S262N/S266R	867
R222Q/S265N/S269T	R219Q/S262N/S266T	868
R222Q/S265N/S269V	R219Q/S262N/S266V	869
R222Q/S265N/S269W	R219Q/S262N/S266W	870

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
R222Q/S265N/S269Y	R219Q/S262N/S266Y	871
R222Q/S265N/K270A	R219Q/S262N/K267A	872
R222Q/S265N/K270C	R219Q/S262N/K267C	873
R222Q/S265N/K270D	R219Q/S262N/K267D	874
R222Q/S265N/K270E	R219Q/S262N/K267E	875
R222Q/S265N/K270F	R219Q/S262N/K267F	876
R222Q/S265N/K270G	R219Q/S262N/K267G	877
R222Q/S265N/K270H	R219Q/S262N/K267H	878
R222Q/S265N/K270I	R219Q/S262N/K267I	879
R222Q/S265N/K270L	R219Q/S262N/K267L	880
R222Q/S265N/K270M	R219Q/S262N/K267M	881
R222Q/S265N/K270N	R219Q/S262N/K267N	882
R222Q/S265N/K270P	R219Q/S262N/K267P	883
R222Q/S265N/K270Q	R219Q/S262N/K267Q	884
R222Q/S265N/K270R	R219Q/S262N/K267R	885
R222Q/S265N/K270S	R219Q/S262N/K267S	886
R222Q/S265N/K270T	R219Q/S262N/K267T	887
R222Q/S265N/K270V	R219Q/S262N/K267V	888
R222Q/S265N/K270W	R219Q/S262N/K267W	889
R222Q/S265N/K270Y	R219Q/S262N/K267Y	890
R222Q/S265N/V299A	R219Q/S262N/V296A	891
R222Q/S265N/V299C	R219Q/S262N/V296C	892
R222Q/S265N/V299D	R219Q/S262N/V296D	893
R222Q/S265N/V299E	R219Q/S262N/V296E	894
R222Q/S265N/V299F	R219Q/S262N/V296F	895
R222Q/S265N/V299G	R219Q/S262N/V296G	896
R222Q/S265N/V299H	R219Q/S262N/V296H	897
R222Q/S265N/V299I	R219Q/S262N/V296I	898
R222Q/S265N/V299K	R219Q/S262N/V296K	899
R222Q/S265N/V299L	R219Q/S262N/V296L	900
R222Q/S265N/V299M	R219Q/S262N/V296M	901
R222Q/S265N/V299N	R219Q/S262N/V296N	902
R222Q/S265N/V299P	R219Q/S262N/V296P	903
R222Q/S265N/V299Q	R219Q/S262N/V296Q	904
R222Q/S265N/V299R	R219Q/S262N/V296R	905
R222Q/S265N/V299S	R219Q/S262N/V296S	906
R222Q/S265N/V299T	R219Q/S262N/V296T	907
R222Q/S265N/V299W	R219Q/S262N/V296W	908
R222Q/S265N/V299Y	R219Q/S262N/V296Y	909
R222Q/K14A/R23A	R219Q/K11A/R20A	910
R222Q/K14A/R23A/K374A	R219Q/K11A/R20A/K371A	911
R222Q/R23A/K374A	R219Q/R20A/K371A	912
R222Q/K14A/K374A	R219Q/K11A/K371A	913
S265N/K14A/R23A	S262N/K11A/R20A	914
S265N/K14A/R23A/K374A	S262N/K11A/R20A/K371A	915
S265N/R23A/K374A	S262N/R20A/K371A	916

Таблица 41. Другие комбинационные варианты		
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	SEQ ID NO:
S265N/K14A/K374A	S262N/K11A/K371A	917

ПРИМЕР 16

КИНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ У КОМБИНАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ rHuADA2 С ДЕЛЕЦИЕЙ В PRB ДОМЕНЕ

Для комбинационных вариантов, содержащих мутацию K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) и делецию в PRB с заменой на линкер $(GGGGS)_n$, приведенных в SEQ ID NO: 588-593, оценивали кинетические параметры активности аденозиндезаминазы, используя способ анализа, описанный в Примере 11.A выше. Первый набор вариантов содержит делецию остатков V102-Q147 (V99-Q144, согласно нумерации зрелой формы) с заменой на линкер $(GGGGS)_n$ различной длины (*например,*, n=1, 2 или 3; приведены в SEQ ID NO: 588-590), а вторая группа вариантов содержат делецию остатков C108-T150 (C105-T147, согласно нумерации зрелой формы) с заменой на линкер $(GGGGS)_n$ различной длины (*например,*, n=1, 2 или 3; приведены в SEQ ID NO: 591-593). Кинетические параметры тестировали при pH 7,6, и результаты приведены в таблице 42.

Результаты свидетельствуют о том, что все протестированные мутанты вариантов ADA2 с делецией в PRB домене сохраняют ферментативную активность и, как правило, имеют K_m, которая при pH 7,6 приблизительно в 5-7 раз ниже по сравнению с WT ADA2, и обладают каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m), которая при pH 7,6 в 8-11 раз выше по сравнению с WT ADA2.

Таблица 42. Кинетические параметры ADA2 WT и ее вариантов при pH 7,6; [E] = 8,5 нМ					
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Vmax (мкМ/мин)	K_m (мМ)	k_{cat} (1/с)	k_{cat}/K_m (1/М*с)
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	43,46	0,89	85,22	95748
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	44,52	0,87	87,29	100338
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	43,01	0,82	84,33	102846
K374D/C108-	K371D/C105-	43,1	0,91	84,51	92532

Таблица 42. Кинетические параметры ADA2 WT и ее вариантов при pH 7,6; [E] = 8,5 нМ					
Замена (нумерация по Zavialov)	Замена (нумерация зрелой формы)	Vmax (мкМ/мин)	K_m (мМ)	k_{cat} (1/с)	k_{cat}/K_m (1/М*с)
T150del→$(GGGGS)_1$	T147del→$(GGGGS)_1$				
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	36,92	0,85	72,39	85167
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	38,12	0,77	74,75	97223

ПРИМЕР 17

ОЦЕНКА ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ (TGI) ДЛЯ ПЕГИЛИРОВАННОЙ rHuADA2-K374D С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CT26 СИНГЕННОЙ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ

Для оценки противоопухолевой активности ADA2 использовали мышиную CT26 сингенную опухолевую модель.

A. Сингенная опухолевая модель и лечение

Сорока четырем (44) самцам мышей BALB/c подкожно инокулировали 5 x 10^6 мышиных опухолевых клеток рака толстой кишки (CT26, ATCC CRL-2638) в объеме 0,1 мл на животное. Объем опухоли определяли с использованием цифровых калиперов, измеряя длину (L) и ширину (W) массы солидной опухоли. Объем опухоли (TV) рассчитывали по формуле: $(L \times W^2)/2$. Опухолям давали расти и мышей с опухолью отбирали для введения им тестируемого препарата, когда опухоли прощупывались, и размер опухоли примерно составлял 50-100 $мм^3$.

Пегилированную rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) получали, как описано в Примере 8.A, с небольшими модификациями с целью создания препарата, в котором приблизительно 100% молекул являются пегилированными, если оценивать с помощью SDS-PAGE. Кратко, препарат rHuADA2-K374D (K371D согласно нумерации зрелой формы) в концентрации 10 мг/мл смешивали с линейным PEG-20K (JenKem Technology, Plano, TX; номер по каталогу M-SCM-20K) в молярном соотношении 1:15 и инкубировали сначала при 4°C в течение 16 часов, а потом при 30°C в течение 60 мин.

Для лечения животных случайным образом распределяли на четыре группы (n=8/группу). Мышам с опухолью CT26 далее внутривенно (IV) через день инъецировали PEG-K374D (PEG-K371D согласно нумерации зрелой

формы) или контрольный носитель (только буфер) в дозах 3 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или 30 мг/кг массы тела. Объем опухоли измеряли на 0 и 8 день, используя для измерения калиперы, как описано выше. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) для каждой отдельной опухолевой модели рассчитывали по следующему уравнению:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

где "T_n" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день "n" после получения финальной дозы PEG-K374D или контроля; "T_0" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день 0 до лечения; "C_n" представляет собой средний объем опухоли в соответствующей контрольной группе в день "n"; и "C_0" представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе в день 0 до лечения. Одна мышь из группы, получающей носитель, была исключена из-за значительного ингибирования роста опухоли.

B. Результаты

В таблице 43 приведены результаты измерения среднего объема опухоли и ингибирования роста опухоли на 8 день у мышей, которым вводили PEG-K374D по сравнению с контрольной группой, получающей носитель. На 8 день средний объем опухоли для контрольной группы, получающий носитель, составил 446,67 мм^3 (n=7). Для группы, которой инъецировали 3 мг/кг PEG-K374D, средний объем опухоли составил 257,72 мм^3, а ингибирование роста опухоли (TGI) 50% (n=8; p-значение = 0,037). Для группы, которой инъецировали 10 мг/кг PEG-K374D, средний объем опухоли составил 207,84 мм^3, а TGI 63% (n=8; p-значение = 0,0056). Для группы, которой инъецировали 30 мг/кг PEG-K374D, средний объем опухоли составил 187,32 мм^3, а TGI 68% (n=8; p-значение = 0,0085). Результаты показывают, что введение PEG-K374D приводит к значительному ингибированию роста опухоли.

Таблица 43. Объем опухоли и ингибирование роста опухоли (TGI) у мышей, которым вводили PEG-K374D

Доза	Число мышей в группе	Средний объем опухоли (мм^3)	Ингибирование роста опухоли	p-значение (t-тест) по сравнению с носителем
Носитель	7	446,67	0%	
3 мг/кг	8	257,72	50%	0,037

10 мг/кг	8	207,84	63%	0,0056
30 мг/кг	8	187,32	68%	0,0085

ПРИМЕР 18

ОЦЕНКА ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ (TGI) ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПЕГИЛИРОВАННОЙ rHuADA2, АНТИТЕЛОМ ПРОТИВ PD-1 И АНТИТЕЛОМ ПРОТИВ CTLA4

Мышиную сингеннуюя опухолевую модель CT26 использовали для сравнения противоопухолевой активности комбинированной терапии пегилированной ADA2 совместно с ингибиторами контрольных точек антителом против PD-1 и антителом против CTLA4. Сингенные опухоли CT26 получали инъецированием 2 x 10^5 клеток CT26 в объеме 0,05 мл на животное в правую претибиальную мышцу самцов мышей Balb/C. Мыши с опухолью оставались в группах лечения, пока средний размер опухоли не достигал 150 $мм^3$.

Для лечения животных случайным образом распределяли на следующие 8 групп (n=8/группе): 1) контрольный солевой носитель, 2) PEG-ADA2-K374D, 3) антитело α-CTLA4 (клон 9D9, номер по каталогу BE0164; BioXCell, West Lebanon, NH, 4) антитело α-PD-1 (клон RMP1-14, номер по каталогу BE0146; BioXCell, West Lebanon, NH), 5) PEG-ADA2-K374D + α-CTLA4; 6) PEG-K374D + α-PD-1; 7) α-CTLA4 + α-PD-1 или 8) тройная комбинированная терапия (PEG-ADA2-K374D + α-CTLA4 + α-PD-1). PEG-ADA2-K374D вводили внутривенно 3x в неделю в дозе 10 мг/кг, α-CTLA4 вводили внутрибрюшинно два раза в неделю в дозе 4 мг/кг и α-PD-1 вводили внутрибрюшинно два раза в неделю в дозе 4 мг/кг. Согласно последовательности дозирования в комбинированной группе сразу же после введения PEG-ADA2-K374D вводили α-CTLA4, после которого вводили α-PD-1.

Объем опухоли оценивали два раза в неделю путем ультразвуковой визуализации с использованием Vevo2100 (Visual Sonics, Toronto, Canada) для определения ингибирования роста опухоли (TGI). Во время измерения объемов опухолей животных анестезировали, используя легкую изофлюрановую анестезию. Для измерения опухоли на интересующую область наносили гель для ультразвуковых исследований (Parker Laboratories, Fairfield, NJ) и

сканирующую головку RMV-716 (глубина фокуса = 17,5 мм) располагали прямо над интересующей областью. В 2D режиме приблизительно устанавливали центр опухоли, далее изображение (~150 - 200 кадров) визуализировали в 3D режиме. Анализировали приблизительно 15-30 кадров из 150-200 кадров и объем опухоли рассчитывали и выражали в $мм^3$. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали, как описано выше.

Результаты представлены в таблице 44. В таблице 44 приведены значения среднего объема опухоли в группе на 10 день исследования (SD10), через 48 часов после введения PEG-ADA2-K374D и через 72 часа после введения α-CTLA4 и α-PD-1, а также диапазон объемов опухоли для всех животных в группе. Также приведены значения TGI по сравнению с контрольной группой, получающей носитель. Результаты показывают, что PEG-ADA2-K374D, α-CTLA4 и α-PD-1 каждый в отдельности способны ингибировать рост опухоли, при этом α-CTLA4 сильнее снижает рост опухоли по сравнению с другими индивидуальными лечениями. Результаты указывают на небольшой синергический эффект от комбинированной терапии PEG-ADA2-K374D совместно с α-CTLA4 или α-PD-1. Также увеличение ингибирования роста опухоли наблюдали для тройной комбинированной терапии. Наоборот, комбинированная терапия α-CTLA4 и α-PD-1 только незначительно усиливает ингибирование роста опхоли по сравнению с лечением α-CTLA4.

Таблица 44. Ингибирование роста опухоли комбинированной терапии

Лечение	**Средний объем опухоли в группе, SD10**	**Диапазон объемов**	**TGI**
Носитель	1567,53	1389-1890	---
PEG-ADA2-K374D	1499,11	1213-1594	5%
α-CTLA4	1050,78	860-1232	37%
α-PD-1	1359,2	1131-1616	15%
PEG-ADA2-K374D + α-CTLA4	965,21	731-1207	43%
PEG-ADA2-K374D + α-PD-1	1244,43	687-1539	23%
α-CTLA4 + α-PD-1	993,97	763-1252	41%
Тройная комбинированная терапия	835,77	687-989	52%

ПРИМЕР 19

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ PEG-ADA2 В ПРЕТИБИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ CT26 ИЛИ НОРМАЛЬНЫХ ОРГАНАХ

Для оценки распределения и элиминирования введенной PEG-ADA2-K374D в опухолевом микроокружении или в нормальных органах использовали иммунофлуоресценцию, чтобы оценить наличие введенной мышам PEG-ADA2-K374D. PEG-ADA2-K374D обрабатывали при комнатной температуре в течение 60 минут сульфгидрильным реакционоспособным красителем DyLight755 (DL755), флуоресцирующим в ближней ИК области спектра, используя набор для мечения антител DyLight 755 Antibody Labeling Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Бычий сывороточный альбумин (BSA, 1 мг/мл), меченный Alexa Fluor 750 (AF 750), получали из (Life Technology, Carlsbad, CA).

A. Распределение в претибиальных опухолях CT26

Сингенные опухоли CT26 получали инъецированием 2 x 10^5 клеток в объеме 0,05 мл на животное в правую претибиальную мышцу самцов мышей Balb/C. Когда средний размер опухоли достигал 600 $мм^3$, мышей с опухолью разделяли на 2 группы (n=4/группе), получающих PEG-ADA2-K374D^{DL755} в концентрации 0,5 мг/кг или BSA^{AF750} в концентрации 0,5 мг/кг внутривенно. Распределение DL755 меченной PEG-ADA2-K374D (PEG-ADA2-K374D^{DL755}) и AF 750 меченного BSA (BSA^{AF750}) в мышиных опухолях оценивали, используя систему IVIS Caliper для флуоресцентной визуализации с длиной волны возбуждения 745 нм и длиной волны излучения 800 нм (Caliper Life Sciences, Alameda, CA), и интенсивность сигнала измеряли с помощью программного обеспечения LivingImage. Изображения получали до введения меченых белков и через 10 минут, 2 часа, 6 часов и день после введения меченых белков.

Результаты приведены в таблице 45. Изображения свидетельствуют о сильной интенсивности флуоресценции в опухолевом сайте во всех группах лечения. Интенсивность флуоресценции изображений продемонстрировала, что PEG-ADA2-K374D^{DL755} быстро попадает в опухоль CT26 и достигает плато через 48 часов. Только 30% PEG-ADA2-K374D^{DL755} было элиминировано из опухолей на 6 день после инъекции PEG-ADA2-K374D^{DL755}. Наоборот, меньше контрольного агента BSA^{AF750} проникало в опухоли, и интенсивность

флуоресценции быстро снижалась. Около 100% BSA^{AF750} было элиминировано из опухолей на 6 день. Таким образом, результаты демонстрируют, что PEG-ADA2-$K374D^{DL755}$ имеют более высокую аффинность к опухолям CT26.

Таблица 45. Распределение в опухоли

Час	BSA^{AF750} (интенсивность флуоресценции)		PEG-ADA2-$K374D^{DL755}$ (интенсивность флуоресценции)	
-1	7,86E+08	±6,92E7	7,80E+08	±5,67E7
0,2	2,95E+09	±9,69E7	4,52E+09	±5,72E8
2	3,92E+09	±2,93E8	4,64E+09	±6,06E8
6	4,64E+09	±7,81E8	6,54E+09	±6,44E8
24	3,18E+09	±4,88E8	9,48E+09	±1,30E9
48	1,94E+09	±7,70E7	1,12E+10	±8,26E8
72	1,30E+09	±1,40E8	8,95E+09	±7,40E8
96	9,86E+08	±2,98E7	1,07E+10	±8,26E8
144	7,78E+08	±3,45E7	4,83E+09	±5,80E8
168	6,39E+08	±7,03E7	3,64E+09	±3,10E8
196	6,59E+08	±3,42E7	2,68E+09	±4,09E8

B. Сравнение распределения в мышах с опухолью CT26 или наивных мышах Balb/C

Чтобы сравнить распределение в наивных мышах, мышей с опухолью CT26 получали, как описано выше, и внутривенно вводили им PEG-ADA2-$K374D^{DL755}$ в концентрации 0,5 мг/кг (n=3). Отдельно, наивным мышам Balb/c также внутривенно вводили PEG-ADA2-$K374D^{DL755}$ в концентрации 0,5 мг/кг (n=4). Мышей умерщвляли и транскардиально перфузировали гепарином с нормальным физиологическим раствором через 24 часа после инъекции PEG-ADA2-$K374D^{DL755}$. Опухоли от мышей с опухолями и органы от наивных мышей собирали и визуализировали с помощью системы визуализации IVIS, и измеряли интенсивность сигнала от DL755 с помощью программного обеспечения LivingImage, как описано выше. Интенсивность сигнала нормировали на вес ткани органа.

Результаты приведены в таблице 46. Интенсивность сигнала или каждого органа была сопоставима с интенсивностью сигнала от опухоли, и приведена в виде отношения (опухоль/орган). Результаты показали, что по сравнению с другими органами наиболее высокая интенсивность сигнала наблюдалась для опухоли. Высокая интенсивность флуоресценции наблюдалась для печени и селезенки, которая была, соответственно, в 1,5 раза и в 2,1 раза меньше, чем в

опухоли. Для других органов, таких как мозг и сердце, наблюдалась низкая интенсивность сигнала, которая была, соответственно, в 29 раз и 11 раз меньше, чем интенсивность сигнала в опухоли. Таким образом, результаты показывают, что PEG-ADA2-K374D^{DL755} имеют более низкую аффинность к нормальным органам.

Таблица 46. Распределение в нормальных органах vs. опухоли

Орган	PEG-ADA2-K374D, 24 ч (интенсивность флуоресценции/вес ткани) – начальное значение		Интенсивность сигнала (Опухоль vs орган)
Легкое	1,22E+06	±1,11E6	5,1
Сердце	5,55E+05	±1,88E5	11,2
Печень	4,02E+06	±5,17E5	1,5
Селезенка	2,98E+06	±7,44E5	2,1
Почки	8,61E+05	±8,23E5	7,2
Толстая кишка	9,13E+05	±3,01E5	6,8
Мозг	2,11E+05	±1,86E5	29,5
Кость	1,82E+06	±7,04E5	3,4
Опухоль	6,22E+06	±2,29E6	-

ПРИМЕР 20

ОЦЕНКА ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ОПУХОЛИ (TGI) И ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ПЕГИЛИРОВАННОЙ rHuADA2-R222Q/S265N С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНГЕННОЙ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ MH194+PSC4

Мышиную сингенную опухолевую модель MH194+PSC4 использовали для оценки противоопухолевой эффективности пегилированной рекомбинантной аденозиндезаминазы 2 (ADA2), пегилированной rHuADA2-R222Q/S265N (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы). Мышиные клетки карциномы поджелудочной железы линии MH194 получали из генетически сконструированной мышиной модели KrasLSL.G12D/+p53R172H/+PdxCretg/+. Клетки PSC4 представляли собой выделенные и иммортализованные звездчатые клетки поджелудочной железы.

A. Сингенная опухолевая модель

Мышиную сингенную опухолевую модель MH194+PSC4 использовали для оценки противоопухолевой эффективности пегилированной рекомбинантной аденозиндезаминазы 2 (ADA2), пегилированной rHuADA2-

R222Q/S265N (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы).

Клетки PSC4 представляли собой выделенные и иммортализованные звездчатые клетки поджелудочной железы. Для получения клеток PSC4 поджелудочную железу из мышей C57BL/6 измельчали лезвием и помещали в 2 мл буфера для расщепления, содержащего 0,05% коллагеназы P, 0,1% ДНКазы и 0,02% проназы в сбалансированном солевом растворе Гея (GBSS). После двух 15 минутных инкубаций в буфере для расщепления при 37°C с тщательным перемешиванием после каждой инкубации, полученную суспензию клеток фильтровали через 100 мкм нейлоновую сетку, промывали дважды GBSS с 0,3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и ресуспендировали в 10 мл GBSS/BSA. Восемь мл Histodenz (Sigma, номер по каталогу D2158) добавляли к суспензии клеток и весь объем пипетировали под 6 мл GBSS/BSA, чтобы создать прерывистый градиент плотности. После центрифугирования в течение 20 мин при 1400g (торможение выставлено в нулевое положение) нужные клетки собирали в интерфазе между двумя слоями плотности и однократно промывали PBS и однократно средой DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% амфотерицина-B (полная среда DMEM). Клетки иммортализовали, используя Lenti-SV40 (Capital Biosciences, номер по каталогу CIP-0011) согласно протоколу производителя. Полученную клеточную линию, названную PSC4, поддерживали в тканевой культуре в виде адгезивного монослоя в полной среде DMEM при 37°C и 5% CO_2. Мышиные клетки карциномы поджелудочной железы линии MH194 получали из генетически сконструированной мышиной модели KrasLSL.G12D/+p53R172H/+PdxCretg/+.

Для создания сингенной опухолевой модели MH194+PSC4 мышам (самцы мышей линии C57BL/6, полученные в возрасте 4–6 недель из Taconic Farms и содержащиеся по 4/клетке) инъецировали 50 мкл суспензии клеток, содержащей парентеральные клетки MH194 совместно с 5×10^5 PSC4 (всего 5×10^6 клеток) внутримышечно в область рядом с надкостницей правой большеберцовой кости.

Тридцати девяти (39) самцам мышей линии C57BL/6 также подкожно инокулировали смесь мышиных опухолевых клеток рака поджелудочной железы

линии MH194 и мышиных звездчатых клеток поджелудочной железы линии PSC4 в количестве 5 x 10^6 в 0,1 мл вводимого объема на животное. Объем опухоли определяли с использованием цифровых калиперов, измеряя длину (L) и ширину (W) массы солидной опухоли. Объем опухоли (TV) рассчитывали по формуле: $(L \times W^2)/2$. Опухолям давали расти и мышей с опухолью отбирали для введения им тестируемого препарата, когда размер опухоли приблизительно составлял 50-100 $мм^3$.

PEG-R222Q/S265N получали, используя способы, аналогичные описанным в Примере 8.A, с небольшими модификациями с целью создания препарата, в котором приблизительно 100% молекул являются пегилированными, если оценивать с помощью SDS-PAGE. Кратко, препарат rHuADA2-R222Q/S265N (R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы) в концентрации 10 мг/мл смешивали с линейным PEG-20K (JenKem Technology, Plano, TX; номер по каталогу M-SCM-20K) в молярном соотношении 1:15 и инкубировали сначала при 4°C в течение 16 часов, а потом при 30°C в течение 60 мин.

Для лечения мышей линии MH194+PSC4 с опухолью случайным образом распределяли на пять групп лечения (n= ≤8): контрольная группа, получающая носитель (только буфер), и четыре группы, получающие PEG-R222Q/S265N в разных терапевтических дозах. Мышам линии MH194+PSC4 с опухолью далее внутривенно (IV) через день инъецировали PEG-R222Q/S265N или носитель в дозах 0,003 мг/кг массы тела, 0,03 мг/кг массы тела, 0,3 мг/кг массы тела и 3 мг/кг массы тела. Объем опухоли измеряли на 0 и 8 день, используя для измерения калиперы, как описано выше. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) для каждой отдельной опухолевой модели рассчитывали по следующему уравнению:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

где "T_n" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день "n" после получения финальной дозы PEG-R222Q/S265N или носителя; "T_0" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день 0 до лечения; "C_n" представляет собой средний объем опухоли в соответствующей контрольной группе в день "n"; и "C_0" представляет собой средний объем

опухоли в контрольной группе в день 0 до лечения. Среднее время выживания (MST) (в днях) рассчитывали как время, в которое 50% мышей в отдельных группах достигли следующих критических показателей: (1) объем опухоли достиг 2000 мм^3, (2) животное потеряло >25% своей массы тела или (3) животное кажется умирающим.

B. Результаты

В таблице 47 приведены результаты измерения среднего объема опухоли и ингибирования роста опухоли на 11 день у мышей, которым вводили PEG-R222Q/S265N, по сравнению с группой, получающей носитель. На 11 день средний объем опухоли для контрольной группы, получающей носитель, составил приблизительно 840 мм^3. Для группы, получающей PEG-R222Q/S265N (0,003 мг/кг), средний объем опухоли составил приблизительно 324 мм^3, а ингибирование роста опухоли (TGI) приблизительно 72% (n = 8; p = 0.036) по сравнению с контрольной группой, получающей носитель, что свидетельствует о том, что введение PEG-R222Q/S265N приводит к значительному ингибированию роста опухоли.

В таблице 48 приведены результаты определения среднего времени выживания у мышей, которым вводили PEG-R222Q/S265N, по сравнению с группой, получающей носитель. Все мыши в контрольной группе умерли между 13 днем и 36 днем, при этом среднее время выживания (MST) составило 27 дней. Пять из восьми мышей, которым инъецировали PEG-R222Q/S265N (в дозе 0,003 мг/кг), прожили больше 41 дня, при этом MST составило 46 дней для мышей, получающих PEG-R222Q/S265N, в дозе 0,003 мг/кг. Эти результаты свидетельствуют о том, что введение PEG-R222Q/S265N значительно увеличивает выживаемость у мышей линии MH194+PSC4 с опухолью.

Таблица 47. Объем опухоли и ингибирование роста опухоли (TGI) у мышей, получающих PEG-R222Q/S265N

Доза (мг/кг)	Число мышей в группе	Средний объем опухоли (мм^3)	Ингибирование роста опухоли	p-значение (t-тест) по сравнению с носителем
Носитель	7	840,1	0%	
0,003	8	323,9	72%	0,0357
0,03	8	680,45	21%	0,56
0,3	8	700,59	20%	0,6

Таблица 47. Объем опухоли и ингибирование роста опухоли (TGI) у мышей, получающих PEG-R222Q/S265N

Доза (мг/кг)	Число мышей в группе	Средний объем опухоли ($мм^3$)	Ингибирование роста опухоли	p-значение (t-тест) по сравнению с носителем
3	8	678,58	22%	0,53

Таблица 48. Среднее время выживания (MST) у мышей, получающих PEG-R222Q/S265N

Доза (мг/кг)	Число мышей в группе	Время выживания (дни)	MST (дни)	Увеличение MST	**p-значение (логарифмический ранговый критерий) по сравнению с носителем
Носитель	7	13 - 36	27	-	
0,003	8	22 - 48+	46	70%	0,041
0,03	8	13 - 48+	26	0%	0,72
0,3	8	13 - 41	32,5	20%	0,49
3	8	13 - 48+	23,5	0%	0,83

** логарифмический ранговый критерий (критерий Кокса-Мантеля)

ПРИМЕР 21

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПЕГИЛИРОВАННОЙ rHuADA2 И анти-PD-1 НА ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА ОПУХОЛИ (TGI)

Мышиную сингенную опухолевую модель рака легкого KLN205 использовали для сравнения противоопухолевой активности пегилированной ADA2-K374D (PEG-K374D; PEG-K371D согласно нумерации зрелой формы) в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки, антителом против PD-1.

Сингенные опухолевые модели KLN205 получали путем подкожного инъецирования тридцати двум (32) мышам DBA/2 мышиных опухолевых клеток рака легкого KLN205 в количестве 5 x 10^5 (ATCC CRL-1453) в объеме 0,1 мл на животное. Мыши с опухолью оставались в группах лечения, пока средний размер опухоли не достигал приблизительно 100 $мм^3$.

Для лечения животных случайным образом распределяли на 4 группы (n=8/группе): 1) контрольный солевой носитель, 2) PEG-K374D, 3) антитело α-PD-1 (клон RMP1-14, номер по каталогу BE0146; BioXCell, West Lebanon, NH)

или 4) PEG-K374D + α-PD-1. PEG-K374D вводили внутривенно два раза в неделю в дозе 0,3 мг/кг, а α-PD-1 вводили внутрибрюшинно два раза в неделю в дозе 2 мг/кг. Согласно последовательности дозирования в комбинированной группе сразу же после введения PEG-K374D вводили α-PD-1.

Объем опухоли измеряли два раза в неделю, используя для измерения калиперы, как описано выше в Примере 17.A. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) для каждой соответствующей опухолевой модели рассчитывали по следующему уравнению:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (T_n - T_0) \div (C_n - C_0)] \times 100\%$$

где "T_n" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день "n" после получения финальной дозы PEG-K374D и α-PD-1 или контроля; "T_0" представляет собой средний объем опухоли для группы лечения в день 0 до лечения; "C_n" представляет собой средний объем опухоли в соответствующей контрольной группе в день "n"; и "C_0" представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе в день 0 до лечения.

Результаты представлены в таблице 49. В таблице 49 приведен средний объем опухоли в группе на 14 день исследования (SD14). Результаты показывают, что введение только PEG-K374D, только α-PD-1 и комбинации PEG-K374D + α-PD-1 ингибирует рост опухоли по сравнению с контрольной группой. Введение только PEG-K374D сильнее ингибирует рост опухоли, чем лечение либо только α-PD-1, либо комбинацией PEG-K374D + α-PD-1.

Таблица 49. Влияние комбинированной терапии на ингибирование роста опухоли в модели опухоли KLN205

Доза	Число мышей в группе	Средний объем опухоли ($мм^3$)	Ингибирование роста опухоли	p-значение (t-тест) по сравнению с носителем
Носитель	8	899,41	0%	
PEG-K374D, 0,3 мг/кг	8	264,56	78%	0,013
α-PD-1, 2 мг/кг	8	545,73	43%	0,16
PEG-K374D + α-PD-1	8	417,79	59%	0,053

ПРИМЕР 22

УДАЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПЕГИЛИРОВАНИЯ

Неконъюгированные, свободные фрагменты пегилирования удаляли из реакции пегилирования вариантов ADA2, используя колонки со смолой Capto

Phenyl. Свободный PEG удаляли из препаратов пегилированной ADA2-K374D (PEG-K374D; PEG-K371D согласно нумерации зрелой формы) и пегилированной rHuADA2-R222Q/S265N (PEG-R222Q/S265N; PEG-R219Q/S262N согласно нумерации зрелой формы), полученных согласно способу пегилирования, описанному в Примере 8.A и 20.A.

Для удаления свободного PEG из препарата PEG-K374D 3,5M сульфат аммония добавляли к PEG-K374D в PBS до достижения финальной концентрации 0,70 M сульфата аммония в PBS. PEG-K374D с сульфатом аммония далее наносили на колонку со смолой Capto Phenyl (GE Healthcare), предварительно уравновешанную 0,70M сульфатом аммония в PBS, в соотношении 5 мг пегилированного белка на мл смолы. Нагруженную смолу Capto Phenyl промывали 10 объемами колонки 0,70M сульфата аммония в PBS. PEG-K374D элюировали уменьшающимся градиентом от 0,70M сульфата аммония в PBS до 0 M сульфата аммония в PBS. Фракции, элюированные после 40% градиента элюции (0,42M сульфата аммония в PBS), объединяли. Объединенную элюированную фракцию концентрировали до концентрации от 1 до 2 мг/мл и анализировали с помощью SDS-PAGE. Свободный PEG детектировали, используя детектор заряженного аэрозоля Corona™ (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Для удаления свободного PEG из PEG-R222Q/S265N 3,5M сульфат аммония добавляли к PEG-R222Q/S265N в PBS до достижения финальной концентрации 0,64 M сульфата аммония в PBS. PEG-R222Q/S265N с сульфатом аммония далее наносили на колонку со смолой Capto Phenyl (GE Healthcare), предварительно уравновешанную 0,64M сульфатом аммония в PBS, в соотношении 5 мг пегилированного белка на мл смолы. Нагруженную смолу Capto Phenyl промывали 10 объемами колонки 0,64M сульфата аммония в PBS. PEG-R222Q/S265N элюировали уменьшающимся градиентом от 0,64M сульфата аммония в PBS до 0 M сульфата аммония в PBS. Фракции, элюированные после 60% градиента элюции (0,256M сульфата аммония в PBS), объединяли. Элюат после дополнительной элюции 20 объемами колонки 15 мМ сульфата аммония, pH 7,0, также объединяли с первой объединенной фаркцией. Объединенную элюированную фракцию концентрировали до концентрации от 1 до 2 мг/мл и

анализировали с помощью SDS-PAGE. Свободный PEG детектировали, используя детектор заряженного аэрозоля Corona™ (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Результаты удаления свободного PEG представлены в таблице 50. Результаты показывают, что количество свободного PEG снизилось приблизительно с 3,7 мг свободного PEG/мг белка до 0,13 мг свободного PEG/мг белка в препарате PEG-K374D, и с 3,8 мг свободного PEG/мг белка до 0,2 мг белка свободного PEG/мг белка в препарате PEG-R222Q/S265N.

Таблица 50. Удаление свободного PEG из препаратов пегилированных вариантов ADA2

	PEG-K374D	**PEG-R222Q/S265N**
Начальное количество белка	6 мг	50 мг
Свободный PEG до колонки со смолой Capto Phenyl	3,7 мг свободного PEG/мг белка	3,8 мг свободного PEG/мг белка
Свободный PEG после колонки со смолой Capto Phenyl	0,13 мг свободного PEG/мг белка	0,2 мг свободного PEG/мг белка
Количество белка, выделенного после удаления свободного PEG	4,5 мг	28,5 мг
Выход белка после удаления свободного PEG	75%	57%

ПРИМЕРЫ 23

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ PH20 В ВИДЕ МУЛЬТИВЕЗИКУЛЯРНЫХ ЛИПОСОМ (MVL)

Для системного введения гиалуронидазы, в том числе растворимые гиалуронидазы, могут быть получены в липидных везикулах, таких как липосомы. Примерами являются мультивезикулярные липосомы (MVL). Различные мультивезикулярные липосомы с замедленным высвобождением PH20 (MVL-PH20) были получены с использованием следующей общей методики, смотрите также международную публикованную заявку PCT номер WO 2012/109387 и опубликованную заявку США номер 2013/0251786. Липидные растворы содержали смеси различных нейтральных липидов, в том числе триглицериды (TG), триолеин ($C_{18:1}$), трикаприлин ($C_{8:0}$) и холестерин, и липиды с положительными и отрицательными зарядами, в том числе фосфатидилхолин (PC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC, $C_{18:1}$),

диерукоилфосфатидилхолин (DEPC, $C_{22:1}$) и дипальмитоилфосфорилглицерин (DPPG, $C_{16:1}$). Общая концентрация PC составила до 19,8 мМ, концентрация холестерина составила 30 мМ, концентрация TG составила до 3,9 мМ, и концентрация DPPG составила 4,2 мМ.

A. Создание лекарственных форм MVL-PH20

Были получены лекарственные формы MVL, содержащие различный молярный процент DEPC и DOPC (0-100%) и различный молярный процент триолеина и трикаприлина (0-100%), DPPG, холестерина и 0,1, 0,25, 0,5, 1 или 2 мг/мл PH20. На первой стадии смешивали и эмульгировали липиды в хлороформе (масляная фаза) и PH20 в первом водной растворе (водная фаза) до образования эмульсии типа вода в масле, при этом PH20 инкапсулировалась в фосфолипидный монослой. На второй стадии добавляли второй водный раствор и эмульгировали, в результате чего образовывалась эмульсия типа вода в масле в воде. После добавления второй аликвоты второго водного раствора растворитель хлороформ выпаривали, и полученный продукт, содержащий мультивезикулярные липосомы, многократно промывали третьим водным раствором, ресуспендировали приблизительно до значения lipocrit, равного 50% (объем упакованной частицы), и хранили при 2-8°C.

Примеры лекарственных форм были получены либо с использованием мини вортекса, либо были получены в больших масштабах с использованием Omni миксера (Omni Macro ES, Omni International, Kennesaw, GA). В способе с Omni миксером раствор липидов в хлороформе (6 мл) эмульгировали при 7000 rpm в течение 8 мин в Omni миксере с 6 мл первого водного раствора (10 мМ His-HCl, pH 6,5, с 5% сахарозы, содержащий различные концентрации PH20) с образованием эмульсии типа вода в масле. В результате дальнейшего эмульгирования при 4500 rpm в течение 1-3 мин с 20 мл второго водного раствора 3,2% глюкозы, содержащего 40 мМ лизина, pH 10,0, получили вторую эмульсию типа вода в масле в воде. Вторую эмульсию переносили поровну в две колбы Эрленмейера, и к обеим колбам добавляли другую аликвоту второго водного раствора объемом 50 мл. Хлороформ удаляли пропусканием азота над поверхностью эмульсии при 35 °C. Частицы MVL, содержащие PH20, промывали три раза 50 мл третьего водного раствора (25 мМ буфера His-HCl, pH

6,0, содержащего 120 мМ NaCl), добавляя раствор, перемешивая путем переворачивания центрифужной пробирки и центрифугируя при 3500 rpm в течение 10 мин при 4 °С в настольной центрифуге с охлаждением. В конце частицы MVL ресуспендировали в третьем водном растворе с образованием лекарственной формы с lipocrit, равным приблизительно 50%, и хранили замороженными при 2-8 °С. Методика с мини вортексом является аналогичной, используемые в ней параметры приведены в таблице 30.

В таблице 51 ниже суммированы первый, второй и третий водные растворы. В таблице 51 также суммированы объемы, концентрации реагентов и другие параметры каждой стадии процесса изготовления MVL.

Таблица 51. Лекарственная форма MVL-PH20 и параметры процесса

1-ый водный раствор	10 мМ His-HCl, pH 6,5, с 5% сахарозы				
2-ой водный раствор	3,2% глюкозы, содержащей 40 мМ лизина, pH 10,0				
3-ий водный раствор	25 мМ буфер His-HCl, pH 6,0, содержащий 120 мМ NaCl				
1^{oe} смешивание эмульсии	Вортекс-миксер		Omni миксер		
PH20 в 1-ом водном растворе	600 мкл		6 мл		
Липидный раствор в хлороформе	600 мкл		6 мл		
Общий объем	1,2 мл		12 мл		
Скорость 1ой эмульсификации	максимальные RPM		7000 RPM		
Время	8 мин		8 мин		
Начальная концентрация белка PH20 (активность)	0,25 мг/мл (30,000 Ед/мл)	0,5 мг/мл (60,000 Ед/мл)	0,5 мг/мл (60,000 Ед/мл)	1,0 мг/мл (120,000 Ед/мл)	2,0 мг/мл (240,000 Ед/мл)
PC	15,8-19,8 мМ		15,8-19,8 мМ		
Холестерин	30 мМ		30 мМ		
TG	3,75-3,9 мМ		3,75-3,9 мМ		
DPPG	4,2 мМ		4,2 мМ		
Тип лезвия 1	Не применимо		Острое с обеих сторон		
Тип лезвия 2	Не применимо		Острое по бокам и внутри		
Тип лезвия 3	Не применимо		Плоские, но острые		
2^{oe} смешивание эмульсии	Вортекс-миксер		Omni миксер		
2ой водный раствор	2,5 мл		20 мл		
Общий объем	3,7 мл		32 мл		
Скорость	максимальные RPM		4500 RPM		
Время	15 сек		1-3 мин		
Выпаривание растворителя	Вортекс-миксер		Omni миксер		
2ой водный раствор	10 мл		100 мл		
Общий объем	13,7 мл		132 мл		
Скорость встряхивания	100-130 RPM		100-130 RPM		

Таблица 51. Лекарственная форма MVL-PH20 и параметры процесса		
водяной бани		
Время	11 мин	15 мин
Температура	35 °C	35 °C
Промывка, замена буфера и ресуспендирование	Вортекс-миксер	Omni миксер
Образец	Весь образец	17 мл
3ий водный раствор	50 мл	50 мл
Общий объем	50 мл	200 мл
Скорость центрифугирования	3500 RPM	3500 RPM
Время	10 мин	10 мин
Число промывок	3	3
Объем ресуспендирования	0,3-0,5 мл	3-5 мл
LIPOCRIT	Вортекс-миксер	Omni миксер
Объем осадка	Варьирует	Варьирует
3ий водный раствор	Варьирует	Варьирует
Скорость	3500 rpm	3500 rpm
Время(мин)	10 мин	10 мин
Объем раствора + осадка	Варьирует	Варьирует
% Lipocrit доведен до	~50%	~50%

B. Краткое описание примеров лекарственных форм MVL-PH20

Несколько лекарственных форм MVL-PH20, содержащих различные молярные соотношения липидов, PH20 и других добавок, были получены с использованием тех же самых общих методик, которые были описаны выше. Различные дополнительные добавки были включены в первый водный раствор для увеличения и сохранения стабильности инкапсулированной PH20. Например, лекарственные формы F68 и F69 содержали хлорид кальция. Лекарственная форма F82 содержала 150 мкл глицерина в качестве интерфазы, разделяющей 600 мкл фазы с хлороформом и 600 мкл фазы с первым водным раствором. Лекарственная форма F83 содержала 0,1% декстрана 40000 и 0,1% PEG-6000. Лекарственные формы F85-F87 содержали олигомеры гиалуроновой кислоты (HA). Для нескольких лекарственных форм методики смешивания/эмульсификации различались. Например, для лекарственной формы F66 первую стадию эмульсификации проводили в течение 4 минут вместо 8 минут, в результате чего были получены более мелкие липосомальные гранулы. Лекарственную форму F67 смешивали на роторе вместо мини вортекса с целью создания меньшего сдвига в процессе смешивания.

В таблице 52 ниже приведены различные лекарственные формы MVL-PH20, в том числе номер лекарственной формы, молярные % соотношения PC (фосфатидилхолин) и TG (триглицерид) в лекарственной форме, начальная концентрация PH20 в мг/мл, миксер, используемый для создания эмульсий, и любые добавки, которые были включены в первый водный раствор.

Таблица 52. Лекарственные формы MVL с PH20

Лекарственная форма	Молярное % соотношение PC & TG в лекарственной форме	Концентрация исходной PH20, мг/мл	Миксер	Добавки в первом водном растворе
F40	DEPC с триолеином	0,25	Мини вортекс	N/A
F41	DEPC с триолеином	0	Мини вортекс	N/A
F42	DEPC с триолеином	0,25 флуоресцентно меченная	Мини вортекс	PH20, меченная AlexaFluor 488
F53	25/75 DEPC/DOPC; 25/75 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс	N/A
F54	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс	N/A
F55	75/25 DEPC/DOPC; 75/25 триолеин/Tricap	0,25	Мини вортекс	N/A
F56	90/10 DEPC/DOPC; 90/10 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс	N/A
F61	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Omni	N/A
F66	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс[1]	N/A
F67	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Rotor Wheel	N/A
F68	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс	20 мМ $CaCl_2$
F69	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Мини вортекс	10 мМ $CaCl_2$
F70	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0.0	Omni	N/A
F71	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,25	Omni	N/A
F72	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,5	Omni	N/A
F73	50/50 DEPC/DOPC;	0,5	Omni	N/A

Таблица 52. Лекарственные формы MVL с PH20				
Лекарственная форма	Молярное % соотношение PC & TG в лекарственной форме	Концентрация исходной PH20, мг/мл	Миксер	Добавки в первом водном растворе
	50/50 триолеин/трикаприлин			
F74	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	N/A
F75	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	2.0	Omni	N/A
F77[2]	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	
F78	DEPC с триолеином	1,0	Omni	N/A
F79	DEPC с триолеином	1,0	Omni	N/A
F80	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	N/A
F81	DEPC с триолеином	0,5	Omni	N/A
F82	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	0,5	Мини вортекс	150 мкл глицерина в качестве интерфазы
F83	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	0,1% декстран 40000 0,1% PEG-6000
F84	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni[3]	N/A
F85	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	15 мг/мл HA 74,000
F85R1	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	15 мг/мл HA 74,000
F86	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	50 мг/мл HA 74,000
F87	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	100 мМ пролин
F88	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	100 мМ Arg-HCl, pH 6,44
F89	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	6% сорбит
F90	50/50 DEPC/DOPC; 50/50 триолеин/трикаприлин	1,0	Omni	6% трегалоза

[1]Более короткое время смешивания первой эмульсии (4 мин)

[2] Холестерин животного происхождения использовали вместо холестерина растительного происхождения в липидном растворе

[3]Более короткое время смешивания первой эмульсии (4 мин) и более короткое время смешивания второй эмульсии (30 сек)

ПРИМЕР 24

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ПРИМЕРОВ ВАРИАНТОВ ADA2 И ОБЛАСТЕЙ МОДИФИЦИРОВАННОГО БЕЛКА

В таблице 53 приведен сводный перечень вариантов полипептидов ADA2, используемых в настоящем документе в качестве примера. В таблице указаны положения для модификации на основе нумерации последовательности по Zavialov и нумерации зрелой последовательности, и примеры SEQ ID NO: вариантов белка ADA2, которые содержат такую модификацию. Понятно, что модификации могут сочетаться друг с другом и что дополнительные варианты также предусмотерны. Указанные аминокислотные остатки обычно могут быть замещены на консервативные аминокислотные замены (см., *например,* Таблицу 3), за исключением таких случаев, как гипергликозилирование, когда консервативная замена не приводит к созданию сайта гликозилирования. Следовательно, например, N может быть замещена на Q или H. Предусмотрены варианты полипептида ADA2, включающие каждую из указанных модификаций. Включены полипептиды, ссылка на последовательность которых приводится с помощью идентификатора последовательностей. Комбинации любых модификаций также предусмотрены. Также предусмотрены модифицированные варианты димеров ADA2, в том числе гомодимеры и гетеродимеры. Также предусмотрены мультимеры вариантов. Также предусмотрены конъюгаты, содержащие варианты и мультимеры и димеры, способы лечения, применения для лечения, комбинации и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе. В последнем столбце указана область или домен, в котором осуществлена модификация, или активность, которая подтверждается модификаций. В целом, мутации, например, увеличивают активность, уменьшают связывание с гепарином, вводят гликозилирование, чтобы помешать нежелательным взаимодействиям и/или увеличить время полужизни в сыворотке, препятствуют взаимодействию или уменьшают взаимодействие PRB домена с каталитически активными частями ADA и/или уменьшают активности, отличные от дезаминазной активности,

такие как активность фактора роста ADA2, за счет нарушения связывания с рецепторами, которые опосредуют такие активности.

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
K14A	K11A	13	Связывание с гепарином
K14D	K11D	14	Связывание с гепарином
K14E	K11E	15	Связывание с гепарином
K16A	K13A	16	Связывание с гепарином
K16D	K13D	17	Связывание с гепарином
K16E	K13E	18	Связывание с гепарином
K374A	K371A	19	Связывание с гепарином
K374D	K371D	20	Связывание с гепарином
K374E	K371E	21	Связывание с гепарином
K375A	K372A	22	Связывание с гепарином
K375D	K372D	23	Связывание с гепарином
K375E	K372E	24	Связывание с гепарином
K455A	K452A	25	Связывание с гепарином
K455D	K452D	26	Связывание с гепарином
K455E	K452E	27	Связывание с гепарином
R23A	R20A	28	Связывание с гепарином
R23D	R20D	29	Связывание с гепарином
R23E	R20E	30	Связывание с гепарином
R369A	R366A	31	Связывание с гепарином
R369D	R366D	32	Связывание с гепарином
R369E	R366E	33	Связывание с гепарином
H267A	H264A	34	Активный сайт
H267Q	H264Q	35	Активный сайт
H267N	H264N	36	Активный сайт
H267G	H264G	37	Активный сайт

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222K	R219K	38	Активный сайт
R222Q	R219Q	39	Активный сайт
R222N	R219N	40	Активный сайт
R222A	R219A	41	Активный сайт
L224A	L221A	42	Активный сайт
L224V	L221V	43	Активный сайт
L224G	L221G	44	Активный сайт
E182D	E179D	45	Активный сайт
E182A	E179A	46	Активный сайт
E182S	E179S	47	Активный сайт
E182T	E179T	48	Активный сайт
E182V	E179V	49	Активный сайт
E182G	E179G	50	Активный сайт
S265A	S262A	51	Активный сайт
S265V	S262V	52	Активный сайт
S265M	S262M	53	Активный сайт
S265N	S262N	54	Активный сайт
K14A/R23A	K11A/R20A	55	Комбинация
K14A/R23A/K374A	K11A/R20A/K371A	56	Комбинация
R23A/K374A	R20A/K371A	57	Комбинация
K14A/K374A	K11A/K371A	58	Комбинация
S265N/K374D	S262N/K371D	59	Комбинация
S265N/K374E	S262N/K371E	60	Комбинация
S265N/R23E	S262N/R20E	61	Комбинация
S265N/R23E/K374D	S262N/R20E/K371D	62	Комбинация
S265N/R23E/K374E	S262N/R20E/K371E	63	Комбинация
K29A	K26A	71	Связывание с гепарином
K29D	K26D	72	Связывание с гепарином
K29E	K26E	73	Связывание с гепарином
R220A	R217A	74	Связывание с гепарином
R220D	R217D	75	Связывание с гепарином
R220E	R217E	76	Связывание с гепарином
K261A	K258A	77	Связывание с гепарином
K261D	K258D	78	Связывание с гепарином
K261E	K258E	79	Связывание с

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
			гепарином
R280A	R277A	80	Связывание с гепарином
R280D	R277D	81	Связывание с гепарином
R280E	R277E	82	Связывание с гепарином
R286A	R283A	83	Связывание с гепарином
R286D	R283D	84	Связывание с гепарином
R286E	R283E	85	Связывание с гепарином
K312A	K309A	86	Связывание с гепарином
K312D	K309D	87	Связывание с гепарином
K312E	K309E	88	Связывание с гепарином
K320A	K317A	89	Связывание с гепарином
K320D	K317D	90	Связывание с гепарином
K320E	K317E	91	Связывание с гепарином
K324A	K321A	92	Связывание с гепарином
K324D	K321D	93	Связывание с гепарином
K324E	K321E	94	Связывание с гепарином
R355A	R352A	95	Связывание с гепарином
R355D	R352D	96	Связывание с гепарином
R355E	R352E	97	Связывание с гепарином
R444A	R441A	98	Связывание с гепарином
R444D	R441D	99	Связывание с гепарином
R444E	R441E	100	Связывание с гепарином
K447A	K444A	101	Связывание с гепарином
K447D	K444D	102	Связывание с гепарином
K447E	K444E	103	Связывание с гепарином
K464A	K461A	104	Связывание с

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
			гепарином
K464D	K461D	105	Связывание с гепарином
K464E	K461E	106	Связывание с гепарином
K472A	K469A	107	Связывание с гепарином
K472D	K469D	108	Связывание с гепарином
K472E	K469E	109	Связывание с гепарином
K473A	K470A	110	Связывание с гепарином
K473D	K470D	111	Связывание с гепарином
K473E	K470E	112	Связывание с гепарином
D89A	D86A	113	Активный сайт
D89C	D86C	114	Активный сайт
D89E	D86E	115	Активный сайт
D89F	D86F	116	Активный сайт
D89G	D86G	117	Активный сайт
D89H	D86H	118	Активный сайт
D89I	D86I	119	Активный сайт
D89K	D86K	120	Активный сайт
D89L	D86L	121	Активный сайт
D89M	D86M	122	Активный сайт
D89N	D86N	123	Активный сайт
D89P	D86P	124	Активный сайт
D89Q	D86Q	125	Активный сайт
D89R	D86R	126	Активный сайт
D89S	D86S	127	Активный сайт
D89T	D86T	128	Активный сайт
D89V	D86V	129	Активный сайт
D89W	D86W	130	Активный сайт
D89Y	D86Y	131	Активный сайт
E182C	E179C	132	Активный сайт
E182F	E179F	133	Активный сайт
E182H	E179H	134	Активный сайт
E182I	E179I	135	Активный сайт
E182K	E179K	136	Активный сайт
E182L	E179L	137	Активный сайт
E182M	E179M	138	Активный сайт

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
E182N	E179N	139	Активный сайт
E182P	E179P	140	Активный сайт
E182Q	E179Q	141	Активный сайт
E182R	E179R	142	Активный сайт
E182W	E179W	143	Активный сайт
E182Y	E179Y	144	Активный сайт
R222C	R219C	145	Активный сайт
R222D	R219D	146	Активный сайт
R222E	R219E	147	Активный сайт
R222F	R219F	148	Активный сайт
R222G	R219G	149	Активный сайт
R222H	R219H	150	Активный сайт
R222I	R219I	151	Активный сайт
R222L	R219L	152	Активный сайт
R222M	R219M	153	Активный сайт
R222P	R219P	154	Активный сайт
R222S	R219S	155	Активный сайт
R222T	R219T	156	Активный сайт
R222V	R219V	157	Активный сайт
R222W	R219W	158	Активный сайт
R222Y	R219Y	159	Активный сайт
L224C	L221C	160	Активный сайт
L224D	L221D	161	Активный сайт
L224E	L221E	162	Активный сайт
L224F	L221F	163	Активный сайт
L224H	L221H	164	Активный сайт
L224I	L221I	165	Активный сайт
L224K	L221K	166	Активный сайт
L224M	L221M	167	Активный сайт
L224N	L221N	168	Активный сайт
L224P	L221P	169	Активный сайт
L224Q	L221Q	170	Активный сайт
L224R	L221R	171	Активный сайт
L224S	L221S	172	Активный сайт
L224T	L221T	173	Активный сайт
L224W	L221W	174	Активный сайт
L224Y	L221Y	175	Активный сайт
S265C	S262C	176	Активный сайт
S265D	S262D	177	Активный сайт
S265E	S262E	178	Активный сайт

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
S265F	S262F	179	Активный сайт
S265G	S262G	180	Активный сайт
S265H	S262H	181	Активный сайт
S265I	S262I	182	Активный сайт
S265K	S262K	183	Активный сайт
S265L	S262L	184	Активный сайт
S265P	S262P	185	Активный сайт
S265Q	S262Q	186	Активный сайт
S265R	S262R	187	Активный сайт
S265T	S262T	188	Активный сайт
S265W	S262W	189	Активный сайт
S265Y	S262Y	190	Активный сайт
H267C	H264C	191	Активный сайт
H267D	H264D	192	Активный сайт
H267E	H264E	193	Активный сайт
H267F	H264F	194	Активный сайт
H267I	H264I	195	Активный сайт
H267K	H264K	196	Активный сайт
H267L	H264L	197	Активный сайт
H267M	H264M	198	Активный сайт
H267P	H264P	199	Активный сайт
H267R	H264R	200	Активный сайт
H267S	H264S	201	Активный сайт
H267T	H264T	202	Активный сайт
H267V	H264V	203	Активный сайт
H267W	H264W	204	Активный сайт
H267Y	H264Y	205	Активный сайт
S269A	S266A	206	Активный сайт
S269C	S266C	207	Активный сайт
S269D	S266D	208	Активный сайт
S269E	S266E	209	Активный сайт
S269F	S266F	210	Активный сайт
S269G	S266G	211	Активный сайт
S269H	S266H	212	Активный сайт
S269I	S266I	213	Активный сайт
S269K	S266K	214	Активный сайт
S269L	S266L	215	Активный сайт
S269M	S266M	216	Активный сайт
S269N	S266N	217	Активный сайт
S269P	S266P	218	Активный сайт

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
S269Q	S266Q	219	Активный сайт
S269R	S266R	220	Активный сайт
S269T	S266T	221	Активный сайт
S269V	S266V	222	Активный сайт
S269W	S266W	223	Активный сайт
S269Y	S266Y	224	Активный сайт
K270A	K267A	225	Активный сайт
K270C	K267C	226	Активный сайт
K270D	K267D	227	Активный сайт
K270E	K267E	228	Активный сайт
K270F	K267F	229	Активный сайт
K270G	K267G	230	Активный сайт
K270H	K267H	231	Активный сайт
K270I	K267I	232	Активный сайт
K270L	K267L	233	Активный сайт
K270M	K267M	234	Активный сайт
K270N	K267N	235	Активный сайт
K270P	K267P	236	Активный сайт
K270Q	K267Q	237	Активный сайт
K270R	K267R	238	Активный сайт
K270S	K267S	239	Активный сайт
K270T	K267T	240	Активный сайт
K270V	K267V	241	Активный сайт
K270W	K267W	242	Активный сайт
K270Y	K267Y	243	Активный сайт
V299A	V296A	244	Активный сайт
V299C	V296C	245	Активный сайт
V299D	V296D	246	Активный сайт
V299E	V296E	247	Активный сайт
V299F	V296F	248	Активный сайт
V299G	V296G	249	Активный сайт
V299H	V296H	250	Активный сайт
V299I	V296I	251	Активный сайт
V299K	V296K	252	Активный сайт
V299L	V296L	253	Активный сайт
V299M	V296M	254	Активный сайт
V299N	V296N	255	Активный сайт
V299P	V296P	256	Активный сайт
V299Q	V296Q	257	Активный сайт
V299R	V296R	258	Активный сайт

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
V299S	V296S	259	Активный сайт
V299T	V296T	260	Активный сайт
V299W	V296W	261	Активный сайт
V299Y	V296Y	262	Активный сайт
R222Q/K374E	R219Q/K371E	263	Комбинация
R222Q/K374D	R219Q/K371D	264	Комбинация
R222Q/R23E	R219Q/R20E	265	Комбинация
R222Q/K374E/R23E	R219Q/K371E/R20E	266	Комбинация
R222Q/K374D/R23E	R219Q/K371D/R20E	267	Комбинация
R222Q/S265N/K374E	R219Q/S262N/K371E	268	Комбинация
R222Q/S265N/K374D	R219Q/S262N/K371D	269	Комбинация
R222Q/S265N/R23E	R219Q/S262N/R20E	270	Комбинация
R222Q/S265N/K374E/R23E	R219Q/S262N/K371E/R20E	271	Комбинация
R222Q/S265N/K374D/R23E	R219Q/S262N/K371D/R20E	272	Комбинация
R222Q/S265N	R219Q/S262N	273	Комбинация
---→N4/---→A5/---→S6	---→N1/---→A2/---→S3	274	Гипер-гликозилирование
R23N/V25S	R20N/V22S	275	Гипер-гликозилирование
K374N/D376S	K371N/D373S	276	Гипер-гликозилирование
K375N/I377S	K372N/I374S	277	Гипер-гликозилирование
T406N/H408S	T403N/H405S	278	Гипер-гликозилирование
G407N/P409S	G404N/P406S	279	Гипер-гликозилирование
C108-T150del→$(Gly)_n$	C105-T147del→$(Gly)_n$	280	Делеция в PRB
C108-T150del→$(Gly)_{15}$	C105-T147del→$(Gly)_{15}$	281	Делеция в PRB
C108-T150del→$(Gly)_{10}$	C105-T147del→$(Gly)_{10}$	282	Делеция в PRB
C108-T150del→$(Gly)_7$	C105-T147del→$(Gly)_7$	283	Делеция в PRB
C108-T150del→$(Gly)_5$	C105-T147del→$(Gly)_5$	284	Делеция в PRB
C108-T150del→$(Gly)_3$	C105-T147del→$(Gly)_3$	285	Делеция в PRB
N101-N159del	N98-N156del	548	Делеция в PRB
C108-E151del	C105-E148del	549	Делеция в PRB
C108-T150del	C105-T147del	550	Делеция в PRB
R128N/P129A	R125N/P126A	552	Гипер-гликозилирование PRB
S130N/K132S	S127N/K129S	553	Гипер-гликозилирование PRB

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
P129N/E131T	P126N/E128T	554	Гипер-гликозилирование PRB
R115N/I117T	R112N/I114T	555	Гипер-гликозилирование PRB
I137N/L138C/L139T	I134N/L135C/L136T	556	Гипер-гликозилирование PRB
I137N/L138S/L139T	I134N/L135S/L136T	557	Гипер-гликозилирование PRB
R145N/Q147S	R142N/Q144S	558	Гипер-гликозилирование PRB
E140N/Y142T	E137N/Y139T	559	Гипер-гликозилирование PRB
P114N/G116S	P111N/G113S	560	Гипер-гликозилирование PRB
F122S	F119S	561	Взаимодействие PRB-ADA
F122K	F119K	562	Взаимодействие PRB-ADA
Y227R	Y224R	563	Взаимодействие PRB-ADA
Y227N	Y224N	564	Взаимодействие PRB-ADA
Y194S	Y191S	565	Взаимодействие PRB-ADA
Y194D	Y191D	566	Взаимодействие PRB-ADA
F186K	F183K	567	Взаимодействие PRB-ADA
Y194D/Y227R	Y191D/Y224R	568	Взаимодействие PRB-ADA
F112S	F109S	569	Взаимодействие PRB-ADA
F112A	F109A	570	Взаимодействие PRB-ADA
R121D	R118D	571	Взаимодействие PRB-ADA
R121A	R118A	572	Взаимодействие PRB-ADA
Y142T	Y139T	573	Взаимодействие PRB-ADA
Y142A	Y139A	574	Взаимодействие PRB-ADA
W136S	W133S	575	Взаимодействие

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
			PRB-ADA
W136T	W133T	576	Взаимодействие PRB-ADA
P127A	P124A	577	Взаимодействие PRB-ADA
P127S	P124S	578	Взаимодействие PRB-ADA
V102-Q147del	V99-Q144del	579	Делеция в PRB
V102-Q147del→(GGGGS)n	V99-Q144del→(GGGGS)n	581	Делеция в PRB
C108-T150del→(GGGGS)n	C105-T147del→(GGGGS)n	582	Делеция в PRB
V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	583	Делеция в PRB
V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	584	Делеция в PRB
V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	585	Делеция в PRB
C108-T150del→$(GGGGS)_1$	C105-T147del→$(GGGGS)_1$	586	Делеция в PRB
C108-T150del→$(GGGGS)_2$	C105-T147del→$(GGGGS)_2$	587	Делеция в PRB
C108-T150del→$(GGGGS)_3$	C105-T147del→$(GGGGS)_3$	588	Делеция в PRB
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	589	Комбинация с делецией в PRB
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	590	Комбинация с делецией в PRB
K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	591	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	592	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	593	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	594	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/--→N4/--→A5/--→S6	R219Q/S262N/--→N1/--→A2/--→S3	596	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/R23N/V25S	R219Q/S262N/R20N/V22S	597	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/K374N/D376S	R219Q/S262N/K371N/D373S	598	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/K375N/I377S	R219Q/S262N/K372N/I374S	599	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/T406N/H408S	R219Q/S262N/T403N/H405S	600	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/G407N/P409S	R219Q/S262N/G404N/P406S	601	Комбинация с Гипер-гликозилированием
R222Q/S265N/C108-	R219Q/S262N/C105-	602	Комбинация с

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
T150del→$(Gly)_{15}$	T147del→$(Gly)_{15}$		делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	603	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{7}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{7}$	604	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{5}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{5}$	605	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(Gly)_{3}$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(Gly)_{3}$	606	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/R128N/P129A	R219Q/S262N/R125N/P126A	607	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/S130N/K132S	R219Q/S262N/S127N/K129S	608	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/P129N/E131T	R219Q/S262N/P126N/E128T	609	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/R115N/I117T	R219Q/S262N/R112N/I114T	610	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/I137N/L138C/L139T	R219Q/S262N/I134N/L135C/L136T	611	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/I137N/L138S/L139T	R219Q/S262N/I134N/L135S/L136T	612	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/R145N/Q147S	R219Q/S262N/R142N/Q144S	613	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/E140N/Y142T	R219Q/S262N/E137N/Y139T	614	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/P114N/G116S	R219Q/S262N/P111N/G113S	615	Комбинация с Гипер-гликозилированием PRB
R222Q/S265N/F122S	R219Q/S262N/F119S	616	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/F122K	R219Q/S262N/F119K	617	Комбинация с взаимодействием

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
			PRB-ADA
R222Q/S265N/Y227R	R219Q/S262N/Y224R	618	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y227N	R219Q/S262N/Y224N	619	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194S	R219Q/S262N/Y191S	620	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194D	R219Q/S262N/Y191D	621	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/F186K	R219Q/S262N/F183K	622	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y194D/Y227R	R219Q/S262N/Y191D/Y224R	623	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/F112S	R219Q/S262N/F109S	624	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/F112A	R219Q/S262N/F109A	625	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/R121D	R219Q/S262N/R118D	626	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/R121A	R219Q/S262N/R118A	627	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y142T	R219Q/S262N/Y139T	628	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/Y142A	R219Q/S262N/Y139A	629	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/W136S	R219Q/S262N/W133S	630	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/W136T	R219Q/S262N/W133T	631	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/P127A	R219Q/S262N/P124A	632	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/P127S	R219Q/S262N/P124S	633	Комбинация с взаимодействием PRB-ADA
R222Q/S265N/V102-	R219Q/S262N/V99-	634	Комбинация с

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
Q147del→$(GGGGS)_1$	Q144del→$(GGGGS)_1$		делецией в PRB
R222Q/S265N/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	635	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	636	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	637	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	638	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	639	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$	640	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$	641	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$	642	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_1$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$	643	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_2$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$	644	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(GGGGS)_3$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$	645	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→(Gly)n	K371D/C105-T147del→(Gly)n	646	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(Gly)_{15}$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$	647	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	648	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(Gly)_7$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$	649	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(Gly)_5$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$	650	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→$(Gly)_3$	K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$	651	Комбинация с делецией в PRB
K374D/V102-Q147del→(GGGGS)n	K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n	652	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del→(GGGGS)n	K371D/C105-T147del→(GGGGS)n	653	Комбинация с делецией в PRB
K374D/N101-N159del	K371D/N98-N156del	654	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-E151del	K371D/C105-E148del	655	Комбинация с делецией в PRB
K374D/C108-T150del	K371D/C105-T147del	656	Комбинация с делецией в PRB
K374D/V102-Q147del	K371D/V99-Q144del	657	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→(Gly)n	R219Q/S262N/C105-T147del→(Gly)n	658	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K14A	R219Q/S262N/K11A	659	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/K14D	R219Q/S262N/K11D	660	Комбинация
R222Q/S265N/K14E	R219Q/S262N/K11E	661	Комбинация
R222Q/S265N/K16A	R219Q/S262N/K13A	662	Комбинация
R222Q/S265N/K16D	R219Q/S262N/K13D	663	Комбинация
R222Q/S265N/V102-Q147del→(GGGGS)n	R219Q/S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n	664	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del→(GGGGS)n	R219Q/S262N/C105-T147del→(GGGGS)n	665	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/N101-N159del	R219Q/S262N/N98-N156del	666	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-E151del	R219Q/S262N/C105-E148del	667	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/C108-T150del	R219Q/S262N/C105-T147del	668	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/V102-Q147del	R219Q/S262N/V99-Q144del	669	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→(Gly)n	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(Gly)n	670	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_{15}$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{15}$	671	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_{10}$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_{10}$	672	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_7$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_7$	673	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_5$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_5$	674	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→$(Gly)_3$	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→$(Gly)_3$	675	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del→(GGGGS)n	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del→(GGGGS)n	676	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del→(GGGGS)n	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del→(GGGGS)n	677	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/N101-N159del	R219Q/S262N/K371D/N98-N156del	678	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-E151del	R219Q/S262N/K371D/C105-E148del	679	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/C108-T150del	R219Q/S262N/K371D/C105-T147del	680	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K374D/V102-Q147del	R219Q/S262N/K371D/V99-Q144del	681	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/S265N/K16E	R219Q/S262N/K13E	682	Комбинация
R222Q/S265N/K374A	R219Q/S262N/K371A	683	Комбинация
R222Q/S265N/K375A	R219Q/S262N/K372A	684	Комбинация
R222Q/S265N/K375D	R219Q/S262N/K372D	685	Комбинация
R222Q/S265N/K375E	R219Q/S262N/K372E	686	Комбинация
R222Q/S265N/K455A	R219Q/S262N/K452A	687	Комбинация
R222Q/S265N/K455D	R219Q/S262N/K452D	688	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/K455E	R219Q/S262N/K452E	689	Комбинация
R222Q/S265N/R23A	R219Q/S262N/R20A	690	Комбинация
R222Q/S265N/R23D	R219Q/S262N/R20D	691	Комбинация
R222Q/S265N/R369A	R219Q/S262N/R366A	692	Комбинация
R222Q/S265N/R369D	R219Q/S262N/R366D	693	Комбинация
R222Q/S265N/R369E	R219Q/S262N/R366E	694	Комбинация
R222Q/S265N/H267A	R219Q/S262N/H264A	695	Комбинация
R222Q/S265N/H267Q	R219Q/S262N/H264Q	696	Комбинация
R222Q/S265N/H267N	R219Q/S262N/H264N	697	Комбинация
R222Q/S265N/H267G	R219Q/S262N/H264G	698	Комбинация
R222K/S265N	R219K/S262N	699	Комбинация
R222N/S265N	R219N/S262N	700	Комбинация
R222A/S265N	R219A/S262N	701	Комбинация
R222Q/S265N/L224A	R219Q/S262N/L221A	702	Комбинация
R222Q/S265N/L224V	R219Q/S262N/L221V	703	Комбинация
R222Q/S265N/L224G	R219Q/S262N/L221G	704	Комбинация
R222Q/S265N/E182D	R219Q/S262N/E179D	705	Комбинация
R222Q/S265N/E182A	R219Q/S262N/E179A	706	Комбинация
R222Q/S265N/E182S	R219Q/S262N/E179S	707	Комбинация
R222Q/S265N/E182T	R219Q/S262N/E179T	708	Комбинация
R222Q/S265N/E182V	R219Q/S262N/E179V	709	Комбинация
R222Q/S265N/E182G	R219Q/S262N/E179G	710	Комбинация
R222Q/S265A	R219Q/S262A	711	Комбинация
R222Q/S265V	R219Q/S262V	712	Комбинация
R222Q/S265M	R219Q/S262M	713	Комбинация
R222Q/S265N/K14A/R23A	R219Q/S262N/K11A/R20A	714	Комбинация
R222Q/S265N/K14A/R23A /K374A	R219Q/S262N/K11A/R20A/ K371A	715	Комбинация
R222Q/S265N/R23A/K374 A	R219Q/S262N/R20A/K371A	716	Комбинация
R222Q/S265N/K14A/K374 A	R219Q/S262N/K11A/K371A	717	Комбинация
R222Q/S265N/K29A	R219Q/S262N/K26A	718	Комбинация
R222Q/S265N/K29D	R219Q/S262N/K26D	719	Комбинация
R222Q/S265N/K29E	R219Q/S262N/K26E	720	Комбинация
R222Q/S265N/R220A	R219Q/S262N/R217A	721	Комбинация
R222Q/S265N/R220D	R219Q/S262N/R217D	722	Комбинация
R222Q/S265N/R220E	R219Q/S262N/R217E	723	Комбинация
R222Q/S265N/K261A	R219Q/S262N/K258A	724	Комбинация
R222Q/S265N/K261D	R219Q/S262N/K258D	725	Комбинация
R222Q/S265N/K261E	R219Q/S262N/K258E	726	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/R280A	R219Q/S262N/R277A	727	Комбинация
R222Q/S265N/R280D	R219Q/S262N/R277D	728	Комбинация
R222Q/S265N/R280E	R219Q/S262N/R277E	729	Комбинация
R222Q/S265N/R286A	R219Q/S262N/R283A	730	Комбинация
R222Q/S265N/R286D	R219Q/S262N/R283D	731	Комбинация
R222Q/S265N/R286E	R219Q/S262N/R283E	732	Комбинация
R222Q/S265N/K312A	R219Q/S262N/K309A	733	Комбинация
R222Q/S265N/K312D	R219Q/S262N/K309D	734	Комбинация
R222Q/S265N/K312E	R219Q/S262N/K309E	735	Комбинация
R222Q/S265N/K320A	R219Q/S262N/K317A	736	Комбинация
R222Q/S265N/K320D	R219Q/S262N/K317D	737	Комбинация
R222Q/S265N/K320E	R219Q/S262N/K317E	738	Комбинация
R222Q/S265N/K324A	R219Q/S262N/K321A	739	Комбинация
R222Q/S265N/K324D	R219Q/S262N/K321D	740	Комбинация
R222Q/S265N/K324E	R219Q/S262N/K321E	741	Комбинация
R222Q/S265N/R355A	R219Q/S262N/R352A	742	Комбинация
R222Q/S265N/R355D	R219Q/S262N/R352D	743	Комбинация
R222Q/S265N/R355E	R219Q/S262N/R352E	744	Комбинация
R222Q/S265N/R444A	R219Q/S262N/R441A	745	Комбинация
R222Q/S265N/R444D	R219Q/S262N/R441D	746	Комбинация
R222Q/S265N/R444E	R219Q/S262N/R441E	747	Комбинация
R222Q/S265N/K447A	R219Q/S262N/K444A	748	Комбинация
R222Q/S265N/K447D	R219Q/S262N/K444D	749	Комбинация
R222Q/S265N/K447E	R219Q/S262N/K444E	750	Комбинация
R222Q/S265N/K464A	R219Q/S262N/K461A	751	Комбинация
R222Q/S265N/K464D	R219Q/S262N/K461D	752	Комбинация
R222Q/S265N/K464E	R219Q/S262N/K461E	753	Комбинация
R222Q/S265N/K472A	R219Q/S262N/K469A	754	Комбинация
R222Q/S265N/K472D	R219Q/S262N/K469D	755	Комбинация
R222Q/S265N/K472E	R219Q/S262N/K469E	756	Комбинация
R222Q/S265N/K473A	R219Q/S262N/K470A	757	Комбинация
R222Q/S265N/K473D	R219Q/S262N/K470D	758	Комбинация
R222Q/S265N/K473E	R219Q/S262N/K470E	759	Комбинация
R222Q/S265N/D89A	R219Q/S262N/D86A	760	Комбинация
R222Q/S265N/D89C	R219Q/S262N/D86C	761	Комбинация
R222Q/S265N/D89E	R219Q/S262N/D86E	762	Комбинация
R222Q/S265N/D89F	R219Q/S262N/D86F	763	Комбинация
R222Q/S265N/D89G	R219Q/S262N/D86G	764	Комбинация
R222Q/S265N/D89H	R219Q/S262N/D86H	765	Комбинация
R222Q/S265N/D89I	R219Q/S262N/D86I	766	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/D89K	R219Q/S262N/D86K	767	Комбинация
R222Q/S265N/D89L	R219Q/S262N/D86L	768	Комбинация
R222Q/S265N/D89M	R219Q/S262N/D86M	769	Комбинация
R222Q/S265N/D89N	R219Q/S262N/D86N	770	Комбинация
R222Q/S265N/D89P	R219Q/S262N/D86P	771	Комбинация
R222Q/S265N/D89Q	R219Q/S262N/D86Q	772	Комбинация
R222Q/S265N/D89R	R219Q/S262N/D86R	773	Комбинация
R222Q/S265N/D89S	R219Q/S262N/D86S	774	Комбинация
R222Q/S265N/D89T	R219Q/S262N/D86T	775	Комбинация
R222Q/S265N/D89V	R219Q/S262N/D86V	776	Комбинация
R222Q/S265N/D89W	R219Q/S262N/D86W	777	Комбинация
R222Q/S265N/D89Y	R219Q/S262N/D86Y	778	Комбинация
R222Q/S265N/E182C	R219Q/S262N/E179C	779	Комбинация
R222Q/S265N/E182F	R219Q/S262N/E179F	780	Комбинация
R222Q/S265N/E182H	R219Q/S262N/E179H	781	Комбинация
R222Q/S265N/E182I	R219Q/S262N/E179I	782	Комбинация
R222Q/S265N/E182K	R219Q/S262N/E179K	783	Комбинация
R222Q/S265N/E182L	R219Q/S262N/E179L	784	Комбинация
R222Q/S265N/E182M	R219Q/S262N/E179M	785	Комбинация
R222Q/S265N/E182N	R219Q/S262N/E179N	786	Комбинация
R222Q/S265N/E182P	R219Q/S262N/E179P	787	Комбинация
R222Q/S265N/E182Q	R219Q/S262N/E179Q	788	Комбинация
R222Q/S265N/E182R	R219Q/S262N/E179R	789	Комбинация
R222Q/S265N/E182W	R219Q/S262N/E179W	790	Комбинация
R222Q/S265N/E182Y	R219Q/S262N/E179Y	791	Комбинация
R222C/S265N	R219C/S262N	792	Комбинация
R222D/S265N	R219D/S262N	793	Комбинация
R222E/S265N	R219E/S262N	794	Комбинация
R222F/S265N	R219F/S262N	795	Комбинация
R222G/S265N	R219G/S262N	796	Комбинация
R222H/S265N	R219H/S262N	797	Комбинация
R222I/S265N	R219I/S262N	798	Комбинация
R222L/S265N	R219L/S262N	799	Комбинация
R222M/S265N	R219M/S262N	800	Комбинация
R222P/S265N	R219P/S262N	801	Комбинация
R222S/S265N	R219S/S262N	802	Комбинация
R222T/S265N	R219T/S262N	803	Комбинация
R222V/S265N	R219V/S262N	804	Комбинация
R222W/S265N	R219W/S262N	805	Комбинация
R222Y/S265N	R219Y/S262N	806	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/L224C	R219Q/S262N/L221C	807	Комбинация
R222Q/S265N/L224D	R219Q/S262N/L221D	808	Комбинация
R222Q/S265N/L224E	R219Q/S262N/L221E	809	Комбинация
R222Q/S265N/L224F	R219Q/S262N/L221F	810	Комбинация
R222Q/S265N/L224H	R219Q/S262N/L221H	811	Комбинация
R222Q/S265N/L224I	R219Q/S262N/L221I	812	Комбинация
R222Q/S265N/L224K	R219Q/S262N/L221K	813	Комбинация
R222Q/S265N/L224M	R219Q/S262N/L221M	814	Комбинация
R222Q/S265N/L224N	R219Q/S262N/L221N	815	Комбинация
R222Q/S265N/L224P	R219Q/S262N/L221P	816	Комбинация
R222Q/S265N/L224Q	R219Q/S262N/L221Q	817	Комбинация
R222Q/S265N/L224R	R219Q/S262N/L221R	818	Комбинация
R222Q/S265N/L224S	R219Q/S262N/L221S	819	Комбинация
R222Q/S265N/L224T	R219Q/S262N/L221T	820	Комбинация
R222Q/S265N/L224W	R219Q/S262N/L221W	821	Комбинация
R222Q/S265N/L224Y	R219Q/S262N/L221Y	822	Комбинация
R222Q/S265C	R219Q/S262C	823	Комбинация
R222Q/S265D	R219Q/S262D	824	Комбинация
R222Q/S265E	R219Q/S262E	825	Комбинация
R222Q/S265F	R219Q/S262F	826	Комбинация
R222Q/S265G	R219Q/S262G	827	Комбинация
R222Q/S265H	R219Q/S262H	828	Комбинация
R222Q/S265I	R219Q/S262I	829	Комбинация
R222Q/S265K	R219Q/S262K	830	Комбинация
R222Q/S265L	R219Q/S262L	831	Комбинация
R222Q/S265P	R219Q/S262P	832	Комбинация
R222Q/S265Q	R219Q/S262Q	833	Комбинация
R222Q/S265R	R219Q/S262R	834	Комбинация
R222Q/S265T	R219Q/S262T	835	Комбинация
R222Q/S265W	R219Q/S262W	836	Комбинация
R222Q/S265Y	R219Q/S262Y	837	Комбинация
R222Q/S265N/H267C	R219Q/S262N/H264C	838	Комбинация
R222Q/S265N/H267D	R219Q/S262N/H264D	839	Комбинация
R222Q/S265N/H267E	R219Q/S262N/H264E	840	Комбинация
R222Q/S265N/H267F	R219Q/S262N/H264F	841	Комбинация
R222Q/S265N/H267I	R219Q/S262N/H264I	842	Комбинация
R222Q/S265N/H267K	R219Q/S262N/H264K	843	Комбинация
R222Q/S265N/H267L	R219Q/S262N/H264L	844	Комбинация
R222Q/S265N/H267M	R219Q/S262N/H264M	845	Комбинация
R222Q/S265N/H267P	R219Q/S262N/H264P	846	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/H267R	R219Q/S262N/H264R	847	Комбинация
R222Q/S265N/H267S	R219Q/S262N/H264S	848	Комбинация
R222Q/S265N/H267T	R219Q/S262N/H264T	849	Комбинация
R222Q/S265N/H267V	R219Q/S262N/H264V	850	Комбинация
R222Q/S265N/H267W	R219Q/S262N/H264W	851	Комбинация
R222Q/S265N/H267Y	R219Q/S262N/H264Y	852	Комбинация
R222Q/S265N/S269A	R219Q/S262N/S266A	853	Комбинация
R222Q/S265N/S269C	R219Q/S262N/S266C	854	Комбинация
R222Q/S265N/S269D	R219Q/S262N/S266D	855	Комбинация
R222Q/S265N/S269E	R219Q/S262N/S266E	856	Комбинация
R222Q/S265N/S269F	R219Q/S262N/S266F	857	Комбинация
R222Q/S265N/S269G	R219Q/S262N/S266G	858	Комбинация
R222Q/S265N/S269H	R219Q/S262N/S266H	859	Комбинация
R222Q/S265N/S269I	R219Q/S262N/S266I	860	Комбинация
R222Q/S265N/S269K	R219Q/S262N/S266K	861	Комбинация
R222Q/S265N/S269L	R219Q/S262N/S266L	862	Комбинация
R222Q/S265N/S269M	R219Q/S262N/S266M	863	Комбинация
R222Q/S265N/S269N	R219Q/S262N/S266N	864	Комбинация
R222Q/S265N/S269P	R219Q/S262N/S266P	865	Комбинация
R222Q/S265N/S269Q	R219Q/S262N/S266Q	866	Комбинация
R222Q/S265N/S269R	R219Q/S262N/S266R	867	Комбинация
R222Q/S265N/S269T	R219Q/S262N/S266T	868	Комбинация
R222Q/S265N/S269V	R219Q/S262N/S266V	869	Комбинация
R222Q/S265N/S269W	R219Q/S262N/S266W	870	Комбинация
R222Q/S265N/S269Y	R219Q/S262N/S266Y	871	Комбинация
R222Q/S265N/K270A	R219Q/S262N/K267A	872	Комбинация
R222Q/S265N/K270C	R219Q/S262N/K267C	873	Комбинация
R222Q/S265N/K270D	R219Q/S262N/K267D	874	Комбинация
R222Q/S265N/K270E	R219Q/S262N/K267E	875	Комбинация
R222Q/S265N/K270F	R219Q/S262N/K267F	876	Комбинация
R222Q/S265N/K270G	R219Q/S262N/K267G	877	Комбинация
R222Q/S265N/K270H	R219Q/S262N/K267H	878	Комбинация
R222Q/S265N/K270I	R219Q/S262N/K267I	879	Комбинация
R222Q/S265N/K270L	R219Q/S262N/K267L	880	Комбинация
R222Q/S265N/K270M	R219Q/S262N/K267M	881	Комбинация
R222Q/S265N/K270N	R219Q/S262N/K267N	882	Комбинация
R222Q/S265N/K270P	R219Q/S262N/K267P	883	Комбинация
R222Q/S265N/K270Q	R219Q/S262N/K267Q	884	Комбинация
R222Q/S265N/K270R	R219Q/S262N/K267R	885	Комбинация
R222Q/S265N/K270S	R219Q/S262N/K267S	886	Комбинация

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации

Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
R222Q/S265N/K270T	R219Q/S262N/K267T	887	Комбинация
R222Q/S265N/K270V	R219Q/S262N/K267V	888	Комбинация
R222Q/S265N/K270W	R219Q/S262N/K267W	889	Комбинация
R222Q/S265N/K270Y	R219Q/S262N/K267Y	890	Комбинация
R222Q/S265N/V299A	R219Q/S262N/V296A	891	Комбинация
R222Q/S265N/V299C	R219Q/S262N/V296C	892	Комбинация
R222Q/S265N/V299D	R219Q/S262N/V296D	893	Комбинация
R222Q/S265N/V299E	R219Q/S262N/V296E	894	Комбинация
R222Q/S265N/V299F	R219Q/S262N/V296F	895	Комбинация
R222Q/S265N/V299G	R219Q/S262N/V296G	896	Комбинация
R222Q/S265N/V299H	R219Q/S262N/V296H	897	Комбинация
R222Q/S265N/V299I	R219Q/S262N/V296I	898	Комбинация
R222Q/S265N/V299K	R219Q/S262N/V296K	899	Комбинация
R222Q/S265N/V299L	R219Q/S262N/V296L	900	Комбинация
R222Q/S265N/V299M	R219Q/S262N/V296M	901	Комбинация
R222Q/S265N/V299N	R219Q/S262N/V296N	902	Комбинация
R222Q/S265N/V299P	R219Q/S262N/V296P	903	Комбинация
R222Q/S265N/V299Q	R219Q/S262N/V296Q	904	Комбинация
R222Q/S265N/V299R	R219Q/S262N/V296R	905	Комбинация
R222Q/S265N/V299S	R219Q/S262N/V296S	906	Комбинация
R222Q/S265N/V299T	R219Q/S262N/V296T	907	Комбинация
R222Q/S265N/V299W	R219Q/S262N/V296W	908	Комбинация
R222Q/S265N/V299Y	R219Q/S262N/V296Y	909	Комбинация
R222Q/K14A/R23A	R219Q/K11A/R20A	910	Комбинация
R222Q/K14A/R23A/K374A	R219Q/K11A/R20A/K371A	911	Комбинация
R222Q/R23A/K374A	R219Q/R20A/K371A	912	Комбинация
R222Q/K14A/K374A	R219Q/K11A/K371A	913	Комбинация
S265N/K14A/R23A	S262N/K11A/R20A	914	Комбинация
S265N/K14A/R23A/K374A	S262N/K11A/R20A/K371A	915	Комбинация
S265N/R23A/K374A	S262N/R20A/K371A	916	Комбинация
S265N/K14A/K374A	S262N/K11A/K371A	917	Комбинация
R222Q/C108-T150del→(Gly)n	R219Q/C105-T147del→(Gly)n	918	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/V102-Q147del→(GGGGS)n	R219Q/V99-Q144del→(GGGGS)n	919	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/C108-T150del→(GGGGS)n	R219Q/C105-T147del→(GGGGS)n	920	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/N101-N159del	R219Q/N98-N156del	921	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/C108-E151del	R219Q/C105-E148del	922	Комбинация с делецией в PRB
R222Q/C108-T150del	R219Q/C105-T147del	923	Комбинация с

Таблица 53. Варианты полипептида ADA2, включающие перечисленные мутации			
Нумерация по Zavialov (SEQ ID NO:4)	Нумерация зрелой формы (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO примеров полипептидов	Тип
			делецией в PRB
R222Q/V102-Q147del	R219Q/V99-Q144del	924	Комбинация с делецией в PRB
S265N/C108-T150del→(Gly)n	S262N/C105-T147del→(Gly)n	925	Комбинация с делецией в PRB
S265N/V102-Q147del→(GGGGS)n	S262N/V99-Q144del→(GGGGS)n	926	Комбинация с делецией в PRB
S265N/C108-T150del→(GGGGS)n	S262N/C105-T147del→(GGGGS)n	927	Комбинация с делецией в PRB
S265N/N101-N159del	S262N/N98-N156del	928	Комбинация с делецией в PRB
S265N/C108-E151del	S262N/C105-E148del	929	Комбинация с делецией в PRB
S265N/C108-T150del	S262N/C105-T147del	930	Комбинация с делецией в PRB
S265N/V102-Q147del	S262N/V99-Q144del	931	Комбинация с делецией в PRB

Поскольку модификации будут очевидны специалистам в данной области техники, предполагается, что это изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания или состояния, выбранного из опухоли, рака и неракового гиперпролиферативного заболевания, у субъекта, включающий введение субъекту белка АДА-2 или его мультимера, где:

белок АДА-2 включает последовательность аминокислотных остатков, приведенную в SEQ ID NO:5, или его каталитически активную часть, или вариант белка АДА-2, имеющий по меньшей мере 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5, или с соответствующей каталитически активной его частью.

2. Способ по п. 1, где белок АДА-2 пегилирован.

3. Способ по п. 1, где белок АДА-2 содержит димер АДА-2.

4. Способ по п. 3, где димер является гомодимером.

5. Способ по п. 4, где димер пегилирован.

6. Способ по п. 1, где белок АДА-2 модифицирован путем делеции всего или части предполагаемого домена связывания с рецептором (PRB), за счет чего белок АДА-2 и его димер не связываются с рецептором фактором роста.

7. Способ по п. 1, где белок АДА-2 модифицирован, за счет чего снижено связывание с гепарином и повышена каталитическая активность.

8. Способ по п. 6, где белок АДА-2 модифицирован, за счет чего снижено связывание с гепарином и повышена каталитическая активность.

9. Способ по п. 1, где:

белок аденозиндезаминазы 2 (АДА-2) или его каталитически активная часть представляет собой вариант АДА-2 или его каталитически активной части;

белок аденозиндезаминазы 2 (АДА-2) или его каталитически активная часть содержит одну или более модификаций в аминокислотной последовательности немодифицированного полипептида АДА-2 или его каталитически активной части;

немодифицированный белок АДА-2 содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:5, или его каталитически активную часть, или последовательность аминокислот имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:5, или ее каталитически активной частью;

аминокислотная модификация(ции) выбраны из аминокислотной замены (замен), делеции (делеций) и вставки(вставок);

вариант белка АДА-2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотному остатку 11, 13, 20, 22, 26, 86, 109, 118,

119, 124, 133, 139, 179, 183, 191, 217, 219, 221, 224, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5;

вариант белка АДА-2, когда он находится в димерной форме, обладает одним или более свойствами, выбранными из повышенной активности аденозиндезаминазы, пониженного связывания с гепарином, увеличенного времени полужизни в сыворотке, измененного pH-оптимума, увеличенной термостабильности, измененного связывания с рецептором и гипергликозилирования по сравнению с соответствующей димерной формой немодифицированного белка АДА-2 с SEQ ID NO: 5 или димерной формой соответствующей каталитически активной его части; и

вариант белка АДА-2, когда он находится в димерной форме, обладает активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин.

10. Способ по п. 9, где:

вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с немодифицированным белком АДА-2 по любой из SEQ ID NO: 326-330 и 380-383 или каталитически активной частью белка АДА-2 по любой из SEQ ID NO: 326-330 и 380-383; и

каталитически активная часть включает весь PRB или делецию всего или части PRB.

11. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с немодифицированным белком АДА-2 с SEQ ID NO: 5.

12. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть обладает измененным связыванием с гепарином.

13. Способ по п. 12, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену одного или более из остатков 11, 13, 20, 26, 217, 258, 277, 283, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 441, 444, 452, 461, 469 и 470 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

14. Способ по п. 13, где аминокислотная замена выбрана из одной или более из K11A, K11D, K11E, K13A, K13D, K13E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452A, K452D, K452E, R20A, R20D, R20E, R366A, R366D, R366E, K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A и K11A/K371A со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

15. Способ по п. 14, где аминокислотная замена выбрана из одной или более из R20E, K371D, K371E, K372D, K372E, K452D, K452E и R366E со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

16. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть обладает измененной каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m) в отношении аденозина или измененной аденозиндезаминазной актиностью.

17. Способ по п. 16, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену одного или более из остатков 86, 179, 219, 221, 262, 264, 266, 267 и 296 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

18. Способ по п. 17, где аминокислотная замена выбрана из одной или более из H264A; H264Q; H264N; H264G; R219K; R219Q; R219N; R219A; L221A; L221V; L221G; E179D; E179A; E179S; E179T; E179V; E179G; S262A; S262V; S262M; S262N; D86A; D86C; D86E; D86F; D86G; D86H; D86I; D86K; D86L; D86M; D86N; D86P; D86Q; D86R; D86S; D86T; D86V; D86W; D86Y; E179C; E179F; E179H; E179I; E179K; E179L; E179M; E179N; E179P; E179Q; E179R; E179W; E179Y; R219C; R219D; R219E; R219F; R219G; R219H; R219I; R219L; R219M; R219P; R219S; R219T; R219V; R219W; R219Y; L221C; L221D; L221E; L221F; L221H; L221I; L221K; L221M; L221N; L221P; L221Q; L221R; L221S; L221T; L221W; L221Y; S262C; S262D; S262E; S262F; S262G; S262H; S262I; S262K; S262L; S262P; S262Q; S262R; S262T; S262W; S262Y; H264C; H264D; H264E; H264F; H264I; H264K; H264L; H264M; H264P; H264R; H264S; H264T; H264V; H264W; H264Y; S266A; S266C; S266D; S266E; S266F; S266G; S266H; S266I; S266K; S266L; S266M; S266N; S266P; S266Q; S266R; S266T; S266V; S266W; S266Y; K267A; K267C; K267D; K267E; K267F; K267G; K267H; K267I; K267L; K267M; K267N; K267P; K267Q; K267R; K267S; K267T; K267V; K267W; K267Y; V296A; V296C; V296D; V296E; V296F; V296G; V296H; V296I; V296K; V296L; V296M; V296N; V296P; V296Q; V296R; V296S; V296T; V296W и V296Y со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

19. Способ по п. 17, где аминокислотная замена выбрана из одной или более из H264Q, H264G, R219K, R219Q, R219N, L221A, L221V, L221G, S262M и S262N со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

20. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть обладает пониженным связыванием с рецептором.

21. Способ по п. 20, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену или делецию в предполагаемом домене связывания с рецептором (PRB).

22. Способ по п. 21, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену одного или более из остатков 109, 118, 119, 124, 133, 139, 183, 191 и 224 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

23. Способ по п. 22, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену, выбранную из одной или более из F109S, F109A, R118D, R118A, F119S, F119K, P124A, P124S, W133S, W133T, Y139A, Y139T, F183K, Y191S, Y191D, Y191D/Y224R, Y224R и Y224N со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

24. Способ по п. 21, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит делецию остатков V99-Q144, или C105-T147, или N98-N156, или C105-E148 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5, или его части, которая подавляет связывание с рецептором.

25. Способ по п. 24, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть включает линкер, содержащий, по меньшей мере, 4 аминокислотных остатка на месте удаленных остатков.

26. Способ по п. 25, где линкер представляет собой:

$(GGGGS)_n$, и n = 1-5; или

(Gly)n, где n = 2 - 20.

27. Способ по п. 26, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замену, делецию, и/или вставку, выбранную из K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_1$, K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_2$, K371D/V99-Q144del→$(GGGGS)_3$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_1$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_2$, K371D/C105-T147del→$(GGGGS)_3$, C105-T147del→$(G)_n$, где n = 1-15, N98-N156del, C105-E148del и C105-T147del со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

28. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит замены, которые добавляют один или более ненативный сайт гликозилирования.

29. Способ по п. 28, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть гипергликозилирована и содержит замены, выбранные из R125N/P126A, S127N/K129S, P126N/E128T, R112N/I114T, I134N/L135C/L136T, I134N/L135S/L136T, R142N/Q144S, P111N/G113S и E137N/Y139T со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5.

30. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит одну или более из замены, делеции и вставки в двух или более из: предполагаемого домена связывания с рецептором (PRB) для снижения связывания с рецептором; домена связывания с гепарином для снижения связывания гепарина; и активного сайта для повышения каталитической активности в активной форме димера варианта белка АДА-2 по сравнению с димерной формой немодифицированного белка АДА-2.

31. Способ по п. 30, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть пегилирована.

32. Способ по п. 3, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть пегилирована.

33. Способ по п. 9, где:

вариант АДА-2 является мультимером, содержащим множество вариантов белка АДА-2 или их каталитически активных частей; и

вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть являются одинаковыми или разными.

34. Способ по п. 33, где вариант АДА-2 является димером, содержащим вариант белка АДА-2 или его каталитически активную часть.

35. Способ по п. 34, где вариант димера АДА-2 или его каталитически активная часть является гомодимером, содержащим два варианта белка или их каталитически активные части, которые являются одинаковыми.

36. Способ по п. 34, где вариант димера АДА-2 или его каталитически активная часть представляет собой гетеродимер, содержащий два варианта белка АДА-2 или их каталитически активные части, отличающиеся друг от друга.

37. Способ по п. 9, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть связана за счет химического или физического взаимодействия прямо или косвенно через линкер с фрагментом, удлиняющим время полужизни.

38. Способ по п. 37, где:

фрагментом, удлиняющим время полужизни, является PEG; и

белок АДА-2 или его каталитически активная часть пегилирована.

39. Способ по п. 9 где немодифицированный белок АДА-2 содержит последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 326-330 и 380-383 или представляет собой его каталитически активную часть.

40. Способ по п. 9, где немодифицированный белок АДА-2 состоит из последовательности аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 5, 326-330 и 380-383 или представляет собой его каталитически активную часть.

41. Способ по п. 1, где белок АДА или вариант белка АДА-2 имеет, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5 или с соответствующей каталитически активной его частью.

42. Способ по п. 1, где белок АДА или вариант белка АДА-2 имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5, или с его каталитически активной частью.

43. Способ по п. 1, где:

белок АДА, или вариант белка АДА-2, или его каталитически активная часть содержит делецию всего или части PRB домена; и

PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5.

44. Способ по п. 43, где белок АДА-2, вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит линкер на месте удаленного PRB домена или на месте части удаленного PRB домена.

45. Способ по п. 44, где линкер представляет собой $(GGGGS)_n$, и n = 1-5; или представляет собой (Gly)n, где n = 2-20.

46. Способ по п. 1, где:

белок АДА-2, вариант белка АДА-2 или каталитически активная часть содержит каталитический домен АДА-2; и

каталитический домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:5.

47. Способ по п. 1, где:

белок АДА-2, вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит каталитический домен белка АДА-2 или последовательность аминокислот, имеющую с ним, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности; и

каталитический домен белка АДА-2 состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:5.

48. Способ по п. 46, где:

белок АДА-2, вариант белка АДА-2 или каталитически активная часть содержит делецию всего или части PRB домена; и

PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 из SEQ ID NO:5.

49. Способ по п. 48, где белок АДА-2, вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть содержит линкер на месте всего или части удаленного PRB домена или удаленной его части.

50. Способ по п. 49, где линкер представляет собой $(GGGGS)_n$, где n=1-5; или представляет собой (Gly)n, где n = 2-20.

51. Способ по п. 9, где белок АДА-2 представляет собой вариант белка АДА-2 или его каталитически активной части, которая содержит делецию всего или части PRB.

52. Способ по п. 51, где белок АДА представляет собой вариант белка АДА-2 или его каталитически активной части, которая содержит линкер на месте удаленного PRB домена или удаленной его части.

53. Способ лечения заболевания или состояния, выбранного из опухоли, рака и неракового гиперпролиферативного заболевания, у субъекта, включающий введение субъекту белка АДА-2 или его мультимера, где:

белок АДА-2 включает последовательность аминокислотных остатков, приведенную в SEQ ID NO:5 или его каталитически активную часть, или вариант белка АДА-2, который имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5, или с соответствующей каталитически активной его частью, где:

вариант белка аденозиндезаминазы 2 (АДА-2) или его каталитически активная часть содержит одну или более модификаций в аминокислотной последовательности немодифицированного полипептида АДА-2 или его каталитически активной части;

немодифицированный белок АДА-2 содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:5, или его каталитически активную часть, или последовательность аминокислот имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в одной из SEQ ID NO:5, 326-334, 340, 375 и 380, или каталитически активной частью одной из SEQ ID NO:5, 326-334, 340, 375 и 380;

аминокислотная модификация(ции) выбраны из аминокислотной замены (замен), делеции (делеций) и вставки(вставок);

белок АДА-2 или вариант белка АДА-2 содержит аминокислотные модификации, включающие одну или более из аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотному остатку 11, 13, 20, 22, 26, 86, 109, 118, 119, 124, 133, 139, 179, 183, 191, 217, 219, 221, 224, 258, 262, 264, 266, 267, 277, 283, 296, 309, 317, 321, 352, 366, 371, 372, 373, 374, 403, 404, 405, 406, 441, 444, 452, 461, 469 или 470 со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5;

белок АДА-2 или вариант белка АДА-2, когда он находится в димерной форме, обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из повышенной активности аденозиндезаминазы, пониженного связывания гепарина, увеличенного времени полужизни в сыворотке, измененного pH-оптимума, увеличенной термостабильности, измененного связывания с рецептором и гипергликозилирования по сравнению с соответствующей димерной формой немодифицированного белка АДА-2 с SEQ ID NO: 5 или димерной формой соответствующей каталитически активной его части; и

белок АДА-2 или вариант белка АДА-2, когда он находится в димерной форме, обладает активностью аденозиндезаминазы, заключающейся в превращении аденозина в инозин.

54. Вариант белка аденозиндезаминазы 2 (АДА-2) или его каталитически активная часть, содержащая модификацию(ции) в последовательности аминокислот стартового белка АДА-2 или в его каталитически активной части, где:

i) стартовый белок АДА-2 выбран из белка АДА-2, содержащего:

a) последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5 и 380-383;

b) последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 380, 381, 382 и 383, в которой весь или часть предполагаемого домена связывания с рецептором (PRB) удалена, где PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5; и

c) последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 5, 380, 381, 382 и 383, в которой весь или часть PRB домена удалена, а на месте удаленных остатков находится линкер, где

PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5; и

линкер представляет собой $(GGGGS)_n$, где n = 1-5, или $(Gly)_n$, где n=2-20;

ii) каталитически активная часть стартового белка АДА-2 выбрана из:

a) последовательности аминокислот, выбранной из каталитического домена полипептидов, приведенных в любой из SEQ ID NO: 5, 380, 381, 382 и 383, где каталитический домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:5;

b) последовательности аминокислот, выбранной из каталитического домена полипептидов, приведенных в любой из SEQ ID NOS: 5, 380, 381, 382 и 383 с полностью или частично удаленным PRB доменом, где:

каталитический домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:5; и

PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5; и

c) последовательности аминокислот, выбранной из каталитического домена полипептидов, приведенных в любой из SEQ ID NO: 5, 380, 381, 382 и 383, с полностью или частично удаленным PRB доменом, где на месте удаленных остатков находится линкер, где:

каталитический домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:5;

PRB домен состоит из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5; и

линкер представляет собой $(GGGGS)_n$, где n = 1-5, или $(Gly)_n$, где n=2-20;

iii) вариант белка АДА-2 содержит одну или более аминокислотных модификации, обеспечивающих пониженное связывание гепарина и выбранных из R20A, R20D, R20E, S262N, R366A, R366D, R366E, K371A, K371D, K371E, K372A, K372D, K372E, K452E, K11A/R20A, K11A/R20A/K371A, R20A/K371A, K11A/K371A, S262N/K371D, S262N/K371E, R20E/S262N, R20E/S262N/K371D и R20E/S262N/K371E со ссылкой на положения аминокислот в SEQ ID NO:5;

iv) вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть имеет до 10 аминокислотных модификаций в дополнение к модификациям остатка (остатков) и в дополнение к любой делеции всего или части PRB домена по сравнению с исходным белком АДА-2 или его каталитически активной частью;

v) аминокислотная модификация(ции) выбраны из замены (замен), делеции (делеций) и вставки(вставок);

vi) вариант белка АДА-2, когда он находится в димерной форме, обладает повышеннрой аденозиндезаминазной актиностью по сравнению с димерной формой стартового белка АДА-2 SEQ ID NO: 5; и

vii) аденозиндезаминазная актиность заключается в превращении аденозина в инозин.

55. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по п. 54, где стартовый белок АДА-2 или его каталитически активная часть содержит делецию всего или части PRB домена.

56. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по п. 55, где:

стартовый белок АДА-2 или его каталитически активная часть содержат линкер на месте удаленного PRB домена; и

линкер представляет собой $(GGGGS)_n$, где n=1-5, или $(Gly)_n$, где n=2-20.

57. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по любому из пп. 54-56, где стартовый белок АДА-2 представляет собой гомодимер, и мономерная форма стартового белка АДА-2 содержит последовательность аминокислотных остатков, приведенную в SEQ ID NO:5.

58. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по любому из пп. 54-57, где стартовый белок АДА-2 содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, или представляет собой его каталитически активную часть.

59. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по любому из пп. 54-58, где вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть пегилирована.

60. Вариант белка АДА-2 или его каталитически активная часть по любому из пп. 54-59, где:

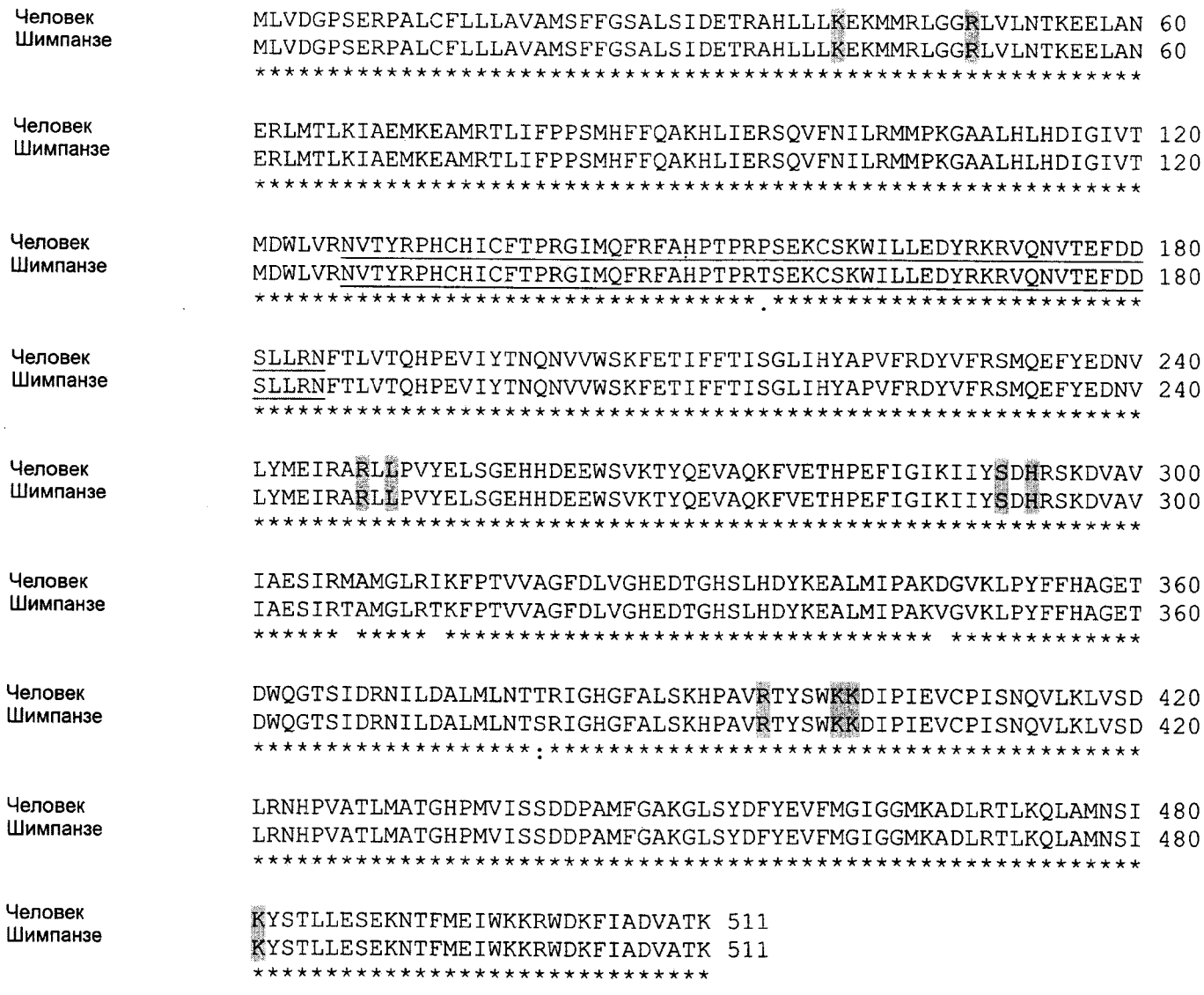
каталитически активная часть содержит домен АДА, который состоит из остатков, соответствующих остаткам 77-473 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:5; и

необязательно включает PRB домен или часть PRB домена, состоящую из остатков, соответствующих остаткам 98-156 в SEQ ID NO:5.

61. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант белка АДА-2 или его каталитически активную часть по любому из пп. 54-60 в фармацевтически приемлемом носителе.

62. Фармацевтическая композиция по п. 61 для использования при лечении рака у субъекта.

63. Способ по любому из пп. 1-53, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак или включает опухоль.


Человек
Шимпанзе
MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
IAESIRTAMGLRTKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKVGVKLPYFFHAGET 360
DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
DWQGTSIDRNILDALMLNTSRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511

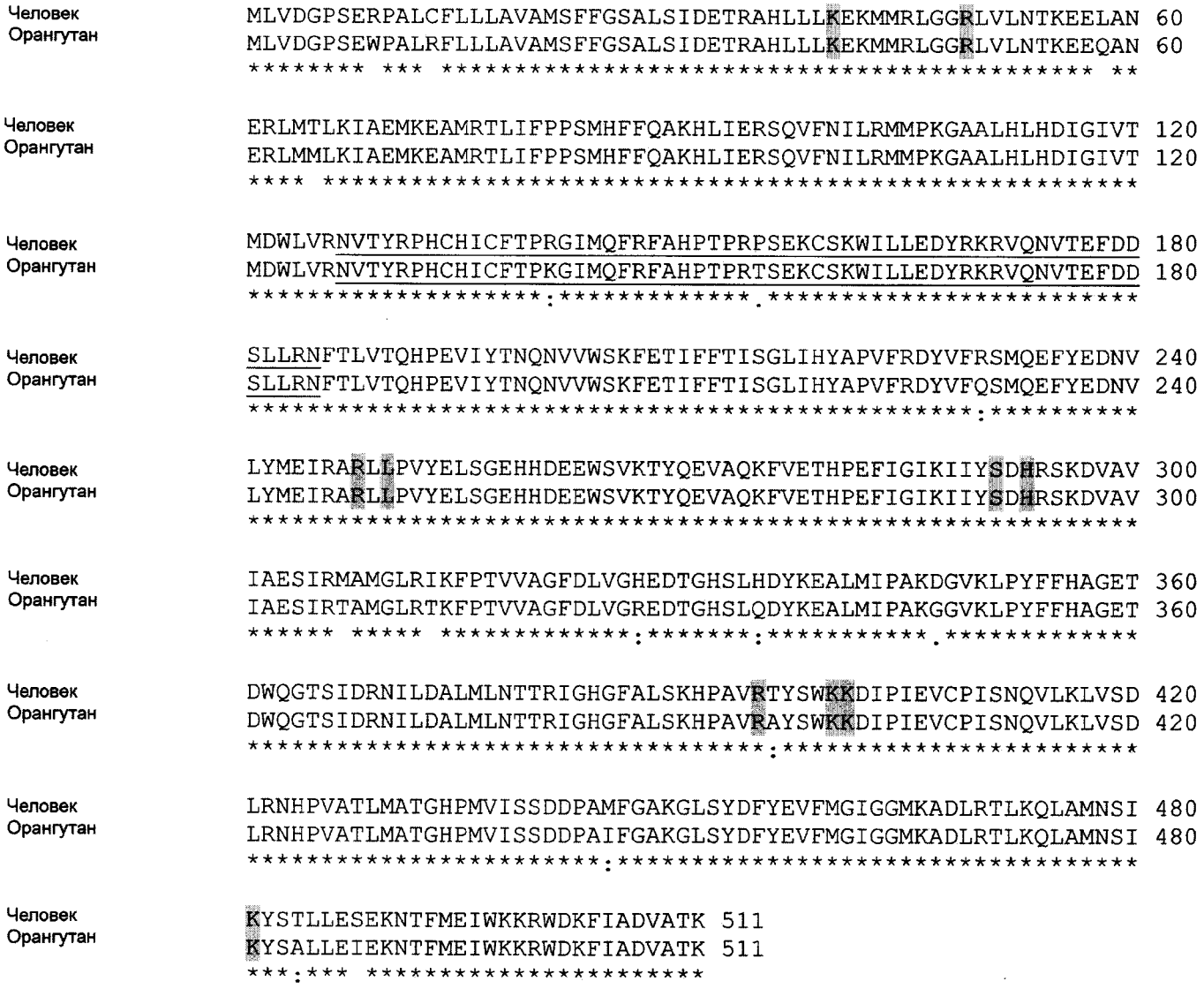
Фигура 1А

```
Человек  MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
Горилла  MLVDGPSERPALRFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
         ************ ************************************************

Человек  ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
Горилла  ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNVLRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
         ****************************************:*******************

Человек  MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
Горилла  MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKQVQNVTEFDD 180
         **********************************.***************:*********

Человек  SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
Горилла  SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFENIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
         ****************************.*******************************

Человек  LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
Горилла  LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
         ************************************************************

Человек  IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
Горилла  IAESIRTAMGLRTKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
         ****** ***** ********************************************

Человек  DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
Горилла  DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
         ************************************************************

Человек  LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
Горилла  LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
         ************************************************************

Человек  KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
Горилла  KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
         *******************************
```

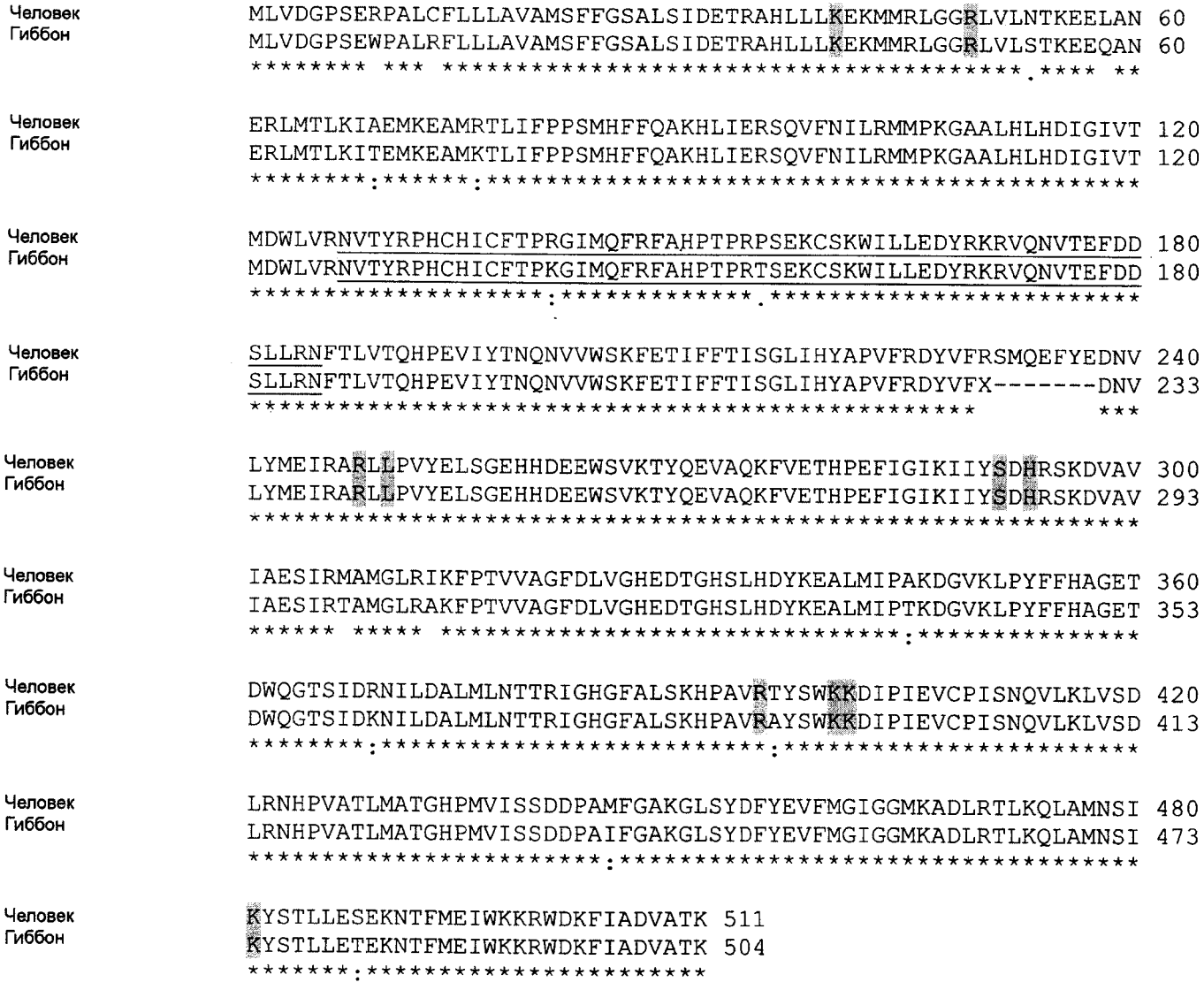
Фигура 1B

```
Человек           MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
Карликовая шимпанзе MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFSSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
                  ************************.**********************************

Человек           ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
Карликовая шимпанзе ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
                  ************************************************************

Человек           MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
Карликовая шимпанзе MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
                  ********************************.***************************

Человек           SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
Карликовая шимпанзе SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
                  ************************************************************

Человек           LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
Карликовая шимпанзе LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
                  ************************************************************

Человек           IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
Карликовая шимпанзе IAESIRTAMGLRTKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKVGVKLPYFFHAGET 360
                  ****** ***** ********************************* ************

Человек           DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
Карликовая шимпанзе DWQGTSIDRNILDALMLNASRIGHGFALSKHPAVRTYSWEKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
                  ******************::*******************:********************

Человек           LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
Карликовая шимпанзе LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
                  ************************************************************

Человек           KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
Карликовая шимпанзе KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
                  ********************************
```

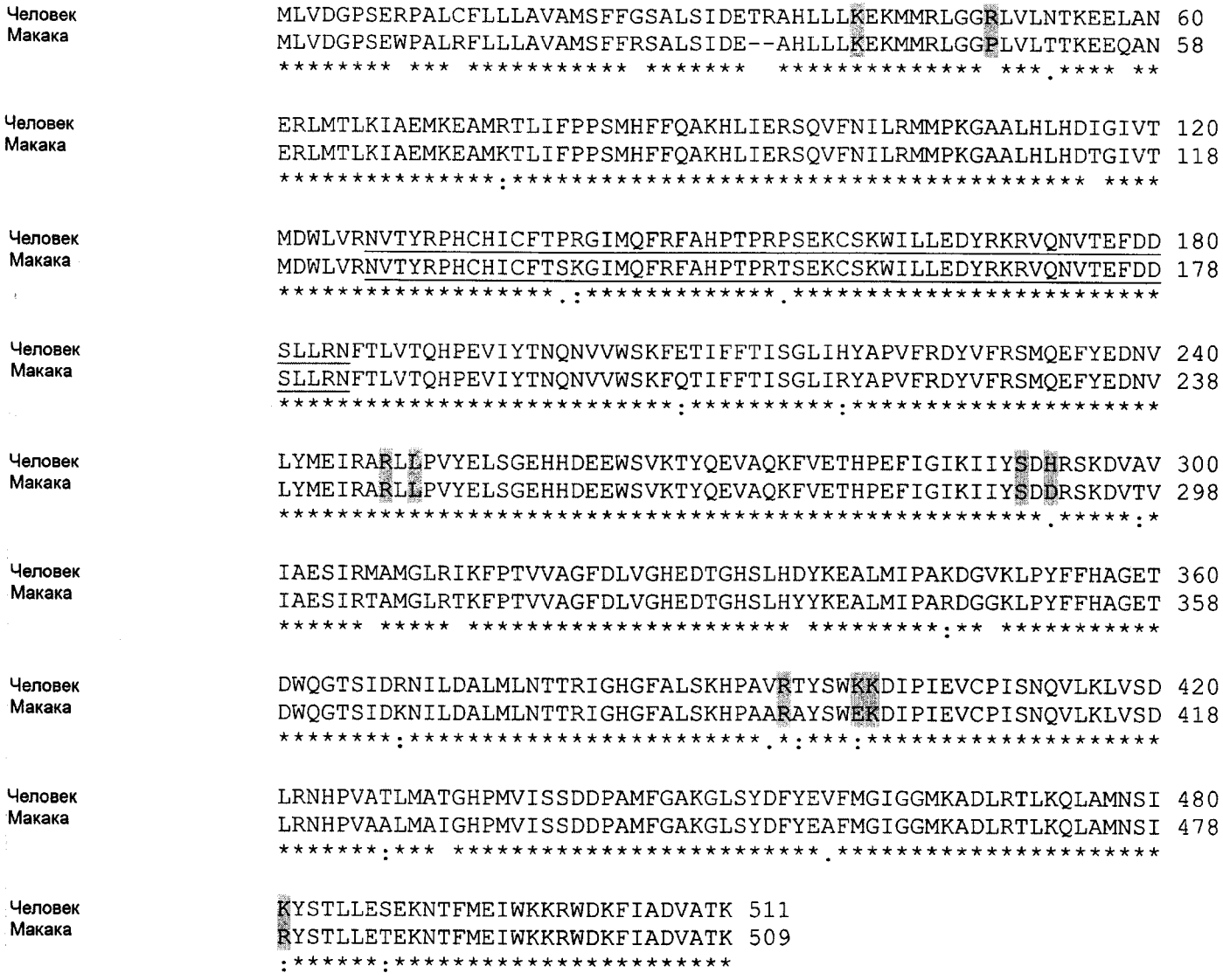
Фигура 1С


Человек
Орангутан
MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
MLVDGPSEWPALRFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEEQAN 60
ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
ERLMMLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFQSMQEFYEDNV 240
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
IAESIRTAMGLRTKFPTVVAGFDLVGREDTGHSLQDYKEALMIPAKGGVKLPYFFHAGET 360
DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRAYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAIFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
KYSALLEIEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511

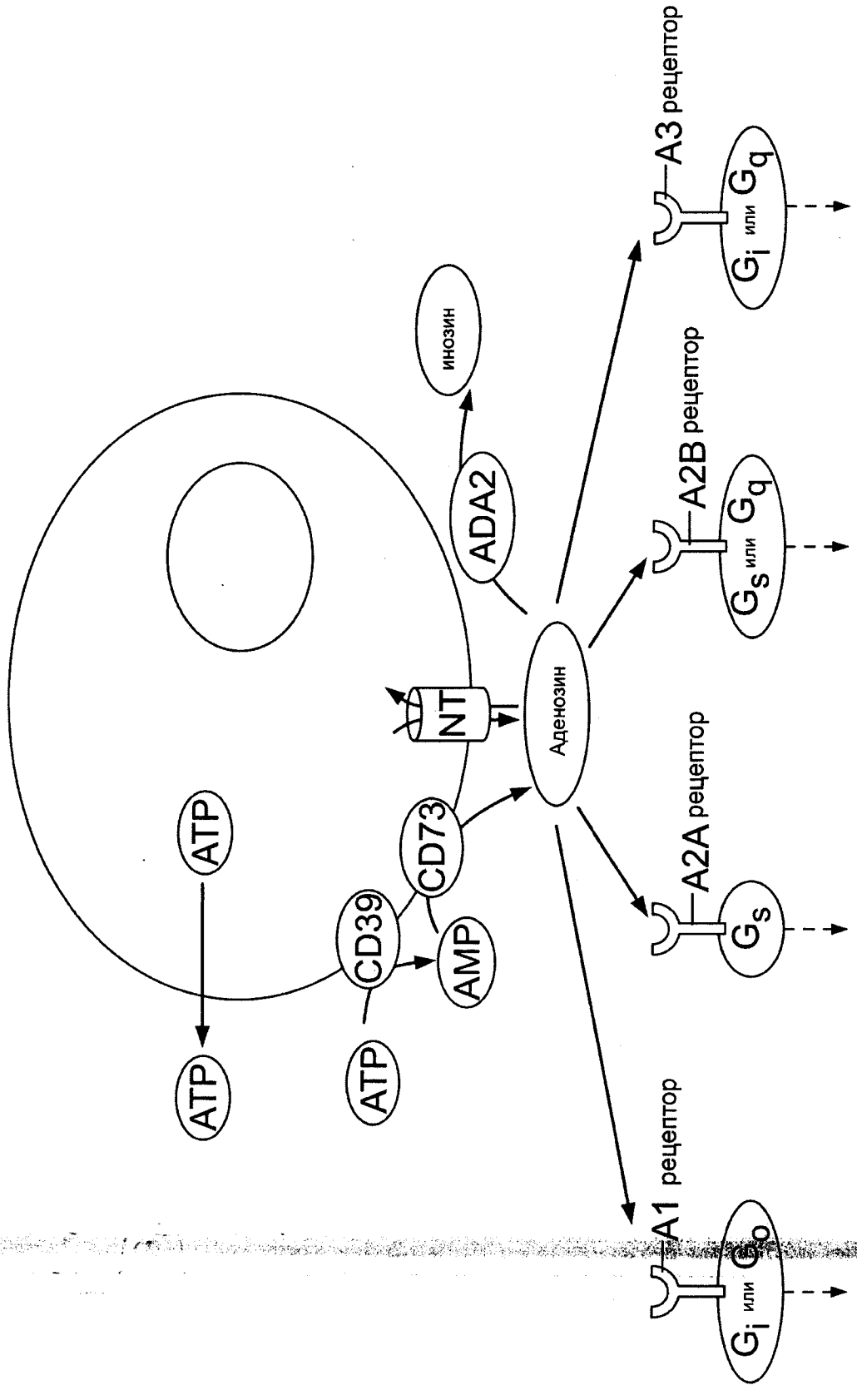
Фигура 1D


Человек
Гиббон
MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
MLVDGPSEWPALRFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLSTKEEQAN 60
ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
ERLMTLKITEMKEAMKTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
MDWLVRNVTYRPHCHICFTPKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFX-------DNV 233
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 293
IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
IAESIRTAMGLRAKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPTKDGVKLPYFFHAGET 353
DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
DWQGTSIDKNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRAYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 413
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAIFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 473
KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
KYSTLLETEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 504

Фигура 1E


Человек MLVDGPSERPALCFLLLAVAMSFFGSALSIDETRAHLLLKEKMMRLGGRLVLNTKEELAN 60
Макака MLVDGPSEWPALRFLLLAVAMSFFRSALSIDE--AHLLLKEKMMRLGGPLVLTTKEEQAN 58
Человек ERLMTLKIAEMKEAMRTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDIGIVT 120
Макака ERLMTLKIAEMKEAMKTLIFPPSMHFFQAKHLIERSQVFNILRMMPKGAALHLHDTGIVT 118
Человек MDWLVRNVTYRPHCHICFTPRGIMQFRFAHPTPRPSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 180
Макака MDWLVRNVTYRPHCHICFTSKGIMQFRFAHPTPRTSEKCSKWILLEDYRKRVQNVTEFDD 178
Человек SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFETIFFTISGLIHYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 240
Макака SLLRNFTLVTQHPEVIYTNQNVVWSKFQTIFFTISGLIRYAPVFRDYVFRSMQEFYEDNV 238
Человек LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDHRSKDVAV 300
Макака LYMEIRARLLPVYELSGEHHDEEWSVKTYQEVAQKFVETHPEFIGIKIIYSDDRSKDVTV 298
Человек IAESIRMAMGLRIKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHDYKEALMIPAKDGVKLPYFFHAGET 360
Макака IAESIRTAMGLRTKFPTVVAGFDLVGHEDTGHSLHYYKEALMIPARDGGKLPYFFHAGET 358
Человек DWQGTSIDRNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAVRTYSWKKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 420
Макака DWQGTSIDKNILDALMLNTTRIGHGFALSKHPAARAYSWEKDIPIEVCPISNQVLKLVSD 418
Человек LRNHPVATLMATGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEVFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 480
Макака LRNHPVAALMAIGHPMVISSDDPAMFGAKGLSYDFYEAFMGIGGMKADLRTLKQLAMNSI 478
Человек KYSTLLESEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 511
Макака RYSTLLETEKNTFMEIWKKRWDKFIADVATK 509

Фигура 1F


ATP
ATP
ATP
CD39
CD73
AMP
NT
Аденозин
ADA2
инозин
A1 рецептор
A2A рецептор
A2B рецептор
A3 рецептор
опосредованные аденозином активности, такие как иммуносупрессия,
пролиферация раковых клеток, миграция и/или метастазирование раковых клеток, ангиогенез
и другие эффекты

Фигура 2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
33320-3121PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2015/055613	14 October 2015 (14-10-2015)	14 October 2014 (14-10-2014)
Applicant		
HALOZYME, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 10 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☒ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      ☐ as suggested by the applicant
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/055613

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/055613

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-209(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-209(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/055613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/78 A61K38/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/35039 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC [US]; FAN PING [US]; SOPPET DANIEL R [US]; L) 13 August 1998 (1998-08-13) figure 1 -----	1-209
A	WO 2005/000099 A2 (GENZYME CORP [US]; ROBERTS BRUCE L [US]) 6 January 2005 (2005-01-06) sequences 39,40 ----- -/--	1-209

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 April 2016	06/05/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Griesinger, Irina

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 16 April 2002 (2002-04-16), "RecName: Full=Adenosine deaminase CECR1; EC=3.5.4.4; AltName: Full=Cat eye syndrome critical region protein 1; Flags: Precursor;", XP002753676, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9NZK5 Database accession no. Q9NZK5 sequence ----- DATABASE UniProt [Online] 13 June 2012 (2012-06-13), "SubName: Full=Adenosine deaminase CECR1 isoform a {ECO:0000313¦EMBL:AFH32795.1};", XP002753677, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H9ZA29 Database accession no. H9ZA29 the whole document ----- DATABASE UniProt [Online] 22 January 2014 (2014-01-22), "SubName: Full=Adenosine deaminase CECR1 {ECO:0000313¦EMBL:CCP78001.1}; Flags: Fragment;", XP002753678, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:U6D5W2 Database accession no. U6D5W2 sequence ----- DATABASE UniProt [Online] 22 February 2012 (2012-02-22), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313¦Ensembl:ENSOGAP00000013329};" , XP002753679, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H0XC51 Database accession no. H0XC51 sequence ----- -/--	1-209 1-209 1-209 1-209

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. V. ZAVIALOV ET AL: "Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 16, 16 April 2010 (2010-04-16), pages 12367-12377, XP055087979, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.083527 abstract page 12369	1-209
A	WO 2008/131208 A1 (ENZON PHARMACEUTICALS INC [US]; FILPULA DAVID R [US]; YOUNGSTER STEPHE) 30 October 2008 (2008-10-30) claim 1; examples 1,5	1-209
A	DATABASE OMIM [Online] NCBI; "Cat Eye Syndrome Chromosome region, Candidate 1; CECR1", XP002753680, Database accession no. 607575 the whole document	1-209

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/055613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9835039 A1	13-08-1998	AU 6272098 A	26-08-1998
		CA 2280287 A1	13-08-1998
		EP 0973888 A1	26-01-2000
		JP 2001511648 A	14-08-2001
		US 5968780 A	19-10-1999
		US 2003186383 A1	02-10-2003
		WO 9835039 A1	13-08-1998
WO 2005000099 A2	06-01-2005	NONE	
WO 2008131208 A1	30-10-2008	AU 2008242748 A1	30-10-2008
		CA 2684750 A1	30-10-2008
		CN 101688244 A	31-03-2010
		EP 2147116 A1	27-01-2010
		HK 1142639 A1	14-02-2014
		JP 5511653 B2	04-06-2014
		JP 2010524472 A	22-07-2010
		KR 20100016302 A	12-02-2010
		NZ 580981 A	24-02-2012
		RU 2009142844 A	27-05-2011
		TW 200902719 A	16-01-2009
		US 2009047271 A1	19-02-2009
		WO 2008131208 A1	30-10-2008

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position 219 and/or at position 262 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5, the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

1.1. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position 219 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5, the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

1.2. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position 262 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5, the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

---

2. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position 11 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5 (see claim 18, first position listed), the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

---

3. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position 13 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5 (see claim 18, second position listed), the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

4-45. claims: 1-209(partially)

relate to an adenosine deaminase variant of ADA2 comprising a mutation at position one of the further positions listed in claims 18 and 19 of the sequence shown in SEQ ID NO: 5, wherein each listed position is considered to be one invention, the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-209(partially)

Claim 1 of the present application relates to a variant Adenosine Deaminase 2 (ADA2) having at least 85% sequence identity to the sequence shown in SEQ ID NO: 5, wherein the dimer is capable to convert adenosine to inosine and the variant has one of the following desired properties of (1) increased adenosine deaminase activity, (2) reduced heparin binding, (3) longer serum half-life, (4) altered pH optimum, (5) increased thermal stability, (6) altered receptor binding and (7) hyperglycosylation. Claim 1 does not teach how said desired properties are achieved. In particular, claim 1 does not teach which amino acid position needs to be modified in order to achieve one of the desired effects. In other words, claim 1 is formulated as a result to be achieved. Consequently, claim 1 is unclear, not supported by the application and not enabling (Articles 5 and 6 PCT). Therefore, no complete search can be performed for the subject-matter of claim 1 and all other claims for which the modification of the ADA2 is not clearly defined (see e.g. claims 2-7 and 10-17).

The application lacks conciseness and the contribution of the art is not clearly defined (Article 6 PCT). In particular, the application comprises 209 claims and 409 pages of the description. The number of claims and pages of the description and also the way the application is drafted makes it difficult if not impossible to identify what the applicant considers to be the contribution to the art. In particular, the provision of variants of ADA2 can not be the contribution to the art, since numerous variants of ADA2 with at least 85% identity to the sequence shown in SEQ ID NO: 5 of the application are already known. For example, Zavialov et al. 2010(cited in the present search report), already discloses the mutation of human ADA2 (see page 12369, paragraph bridging left-and right-hand column). Furthermore, naturally occurring variants cannot be distinguished from variants obtained artificially, since they are structurally identical. Therefore, the sequence from the rhesus macaque shown in UNIPROT: H9ZA29 (cited in the search report) or the known allelic variants of the human gene which may provoke diseases are also considered to fall under the scope of claim 1 (a summary of known variants of ADA2 can be obtained from known databases such as OMIM, see citation in the search report). Hence, the provision of ADA2 variants cannot be the contribution to the art. Since neither the claims nor the application as a whole seem to clearly state what the applicant considers to be the contribution to the art, the application as a whole is considered unclear.

The search examiner sent an invitation to provide informal clarification to the application. In his response, the applicant indicated that he considered a variant of ADA2 having at least 95% identity to the sequence shown in SEQ ID NO: 5 of the application comprising a mutation at position 219 and/or 262 and the corresponding nucleic acid sequences, vectors, host cells, production methods and uses to be the invention of interest. Hence, the search and the search opinion are limited accordingly.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.