

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293274 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.16

(51) Int. Cl. C12N 9/52 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.18

(54) ЦИСТЕИН-ПРОТЕАЗА

(31) 2007431.6

(32) 2020.05.19

(33) GB

(86) PCT/EP2021/063131

(87) WO 2021/233911 2021.11.25

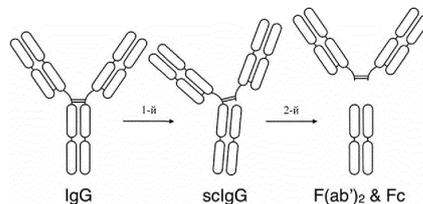
(71) Заявитель:
ХАНСА БИОФАРМА АБ (SE)

(72) Изобретатель:

Нордаль Эмма Андерссон, Челльман
Кристиан, Кархумаа Кайса, Рупе Карл
Маркус, Бокерманн Роберт, Ярнум
София (SE)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к новому полипептиду, который проявляет активность цистеин-протеазы IgG, и его применению *in vivo* и *ex vivo*. Применение полипептида включает способы предотвращения или лечения заболеваний и состояний, опосредованных IgG, и способы анализа IgG и получения фрагментов F(ab')₂ *in vitro*.



A1

202293274

202293274

A1

ЦИСТЕИН-ПРОТЕАЗА

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, который проявляет
5 активность цистеин-протеазы IgG, и его применению *in vivo* и *ex vivo*. Применение полипептида включает способы предотвращения или лечения заболеваний и состояний, опосредованных IgG, и способы анализа IgG и получения фрагментов F(ab')₂ *in vitro*.

Уровень техники

IdeS (фермент *S. pyogenes*, расщепляющий иммуноглобулин G, также известный как имплицитидоза) представляет собой внеклеточную цистеин-протеазу, продуцируемую патогеном человека *S. pyogenes*. Первоначально IdeS был выделен из штамма *Streptococcus* группы A серотипа M1, но в настоящее время ген *ides*
15 идентифицирован во всех протестированных штаммах *Streptococcus* группы A. IdeS обладает необычайно высокой степенью субстратной специфичности, единственным идентифицированным субстратом которого является IgG. IdeS катализирует одиночное протеолитическое расщепление в нижней шарнирной области тяжелых цепей всех подклассов IgG человека. IdeS также катализирует эквивалентное
20 расщепление тяжелых цепей некоторых подклассов IgG у различных животных. IdeS эффективно расщепляет IgG на фрагменты Fc и F(ab')₂ по двухстадийному механизму. На первой стадии расщепляется одна (первая) тяжелая цепь IgG с образованием одной расщепленной молекулы IgG (scIgG) с одной нековалентно связанной Fc-цепью. Молекула scIgG фактически является промежуточным продуктом, который сохраняет
25 оставшуюся (вторую) тяжелую цепь исходной молекулы IgG. На второй стадии механизма эта вторая тяжелая цепь расщепляется IdeS с высвобождением фрагмента F(ab')₂ и гомодимерного фрагмента Fc. Это продукты, обычно наблюдаемые в физиологических условиях. Гомодимерный Fc может диссоциировать на составляющие его мономеры. В восстанавливающих условиях фрагмент F(ab')₂ может
30 диссоциировать на два фрагмента Fab. Было показано, что способность IdeS к расщеплению IgG полезна *ex vivo*, например, в способах получения фрагментов Fab, F(ab')₂ и Fc, которые можно использовать, например, для анализа IgG и получения фрагментов F(ab')₂ *in vitro*. См., например, WO2003051914 и WO2009033670. Также было показано, что IdeS применим *in vivo* в качестве терапевтического агента,
35 поскольку он способен расщеплять *in vivo* молекулы IgG, которые опосредуют заболевание или являются нежелательными по иным причинам. См., например, WO2006131347 и WO2013110946. IdeS можно использовать в качестве терапии

любого заболевания или состояния, полностью или частично опосредованного IgG. IgG способствует патологии многих аутоиммунных состояний, а также острому отторжению трансплантированных органов.

Однако IdeS является иммуногенным белком. То есть, когда IdeS используется в качестве терапевтического агента, иммунная система субъекта, получающего IdeS, часто будет реагировать на него. Реакция иммунной системы на IdeS обычно включает выработку антител, специфичных для IdeS. Эти антитела могут упоминаться в настоящем документе как антилекарственные антитела (ADA), специфичные для IdeS, или «IdeS-специфичные ADA». Иммунный ответ на IdeS в целом и получение IdeS-специфичных ADA в частности могут вызывать два связанных типа проблем. Во-первых, эффективность IdeS может быть снижена, например, из-за связывания ADA, потенциально требующего более высоких или повторных доз для достижения того же эффекта. ADA, обладающие таким эффектом, можно назвать «нейтрализующими ADA». Во-вторых, могут возникнуть нежелательные или даже вредные осложнения, такие как воспалительная гиперреакция, запускаемая иммунными комплексами ADA и IdeS. Чем выше количество ADA, специфичных для IdeS, у данного субъекта, тем больше вероятность возникновения этих проблем. Присутствие и количество IdeS-специфичных молекул ADA у пациента можно определить любым подходящим способом, таким как специфичный для агента тест CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ титра, проводимый в образце сыворотки пациента. Количество IdeS-специфичных молекул ADA у пациента выше порога, установленного клиницистом, может препятствовать введению IdeS или указывать на то, что требуется более высокая доза IdeS. Такая более высокая доза может, в свою очередь, привести к увеличению количества IdeS-специфичных молекул ADA у пациента, что препятствует дальнейшему введению IdeS.

IdeS является фактором вирулентности *S. pyogenes*, который отвечает за распространенные инфекции, такие как тонзиллит и острый фарингит. Соответственно, большинство людей сталкивались с IdeS в этом контексте и, вероятно, имеют антитела против IdeS в кровотоке. Различные уровни IdeS-специфичного ADA обычно можно обнаружить в образцах сыворотки людей (вероятно, из-за предшествующих стрептококковых инфекций), а также в препаратах IVIg (внутривенный иммуноглобулин), которые представляют собой препараты IgG, извлеченные из объединенной сыворотки тысяч доноров. Способы обнаружения IdeS-специфичного ADA известны в данной области техники. Даже если субъект не обладает IdeS-специфичным ADA до первоначального введения IdeS, вполне вероятно, что такие молекулы будут продуцироваться впоследствии. Таким образом, для любого конкретного субъекта проблемы, связанные с иммуногенностью IdeS,

вероятно, представляют собой препятствие для применения IdeS в качестве лечения. Эти проблемы могут потребовать увеличения дозы IdeS и/или полного исключения лечения посредством IdeS, особенно если требуются повторные введения. Существующие подходы к проблемам этого типа включают, например, пегилирование терапевтического агента для снижения иммуногенности или совместное введение терапевтического средства с иммунодепрессантом.

IdeZ представляет собой цистеин-протеазу IgG, продуцируемую *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*, бактерией, преимущественно встречающейся у лошадей. IdeZ имеет примерно 66% идентичности с IdeS. Поскольку *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* не является патогеном для человека, IdeZ рассматривали как альтернативу терапии на основе IdeS, поскольку у людей может быть меньше антител (антилекарственные антитела, ADA) против IdeZ или они вообще отсутствуют. Однако IdeZ имеет уровень активности цистеин-протеазы IgG в отношении IgG человека, который значительно ниже, чем у IdeS, в частности, при расщеплении IgG2.

Таким образом, остается потребность в цистеин-протеазах, полученных из IdeZ, обладающих высокой активностью (предпочтительно выше, чем у IdeZ дикого типа, и еще более предпочтительно выше, чем у IdeS) в отношении IgG человека. В частности, остается потребность в цистеин-протеазах, полученных из IdeZ, обладающих высокой активностью (предпочтительно выше, чем у IdeZ дикого типа, и еще более предпочтительно выше, чем у IdeS) в отношении IgG1 и IgG2 человека.

Краткое описание сущности изобретения

Полная последовательность IdeS является общедоступной как референсная последовательность NCBI № WP_010922160.1 и представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 6. Эта последовательность включает N-концевой метионин, за которым следует сигнальная последовательность секреции из 28 аминокислот. N-концевой метионин и сигнальная последовательность (всего 29 аминокислот на N-конце) обычно удаляются с образованием зрелого белка IdeS, последовательность которого является общедоступной под номером доступа Genbank ADF13949.1 и представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 4.

Полная последовательность IdeZ является общедоступной как референсная последовательность NCBI № WP_014622780.1 и представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 5. Эта последовательность включает N-концевой метионин, за которым следует сигнальная последовательность секреции из 33 аминокислот. N-концевой метионин и сигнальная последовательность (всего 34 аминокислоты на N-конце) обычно удаляются с образованием зрелого белка IdeZ, последовательность которого представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 3.

Авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать специфические положения в последовательности IdeZ, которые при модификации, как описано в настоящем документе, приводят к новым полипептидам, которые обладают повышенной активностью цистеин-протеазы IgG в отношении IgG человека по сравнению с IdeZ. Активность цистеин-протеазы IgG в отношении IgG человека (например, при расщеплении IgG человека) полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно является по меньшей мере такой же высокой, как активность цистеин-протеазы IgG в отношении IgG IdeS человека. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным в расщеплении IgG человека, чем цистеин-протеаза IgG IdeS, особенно когда IgG представляет собой изотип IgG1 или IgG2. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным в расщеплении IgG человека, чем цистеин-протеаза IgG IdeS, особенно при измерении расщепления второй цепи IgG1. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным при расщеплении IgG1, чем IgG2. Полипептид согласно настоящему изобретению обычно является менее иммуногенным, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ.

Если не указано иное, все ссылки на нумерацию положений аминокислот в раскрытых в настоящем документе полипептидах, основаны на нумерации соответствующих положений в SEQ ID NO: 5, начиная с N-конца. Таким образом, поскольку в SEQ ID NO: 1 отсутствует N-концевой метионин и сигнальная последовательность из 33 аминокислот SEQ ID NO: 5, остаток аспарагиновой кислоты (D) на N-конце SEQ ID NO: 1 обозначается как положение 35, как соответствующее положение в SEQ ID NO: 5. Применяя эту схему нумерации, наиболее важным остатком для активности цистеин-протеазы IgG IdeS является цистеин (C) в положении 102, соответствующем SEQ ID NO: 5. Другими остатками, которые, вероятно, важны для активности цистеин-протеазы IgG, являются лизин (K) в положении 92, гистидин (H) в положении 272 и две аспарагиновые кислоты (D) в положениях 294 и 296, соответствующие SEQ ID NO: 5. Также было обнаружено, что делеция первых двадцати остатков на N-конце SEQ ID NO: 1 может повышать активность полипептида, который включает это изменение, и/или может снижать иммуногенность без неблагоприятного воздействия на активность. Первые двадцать остатков на N-конце SEQ ID NO: 1 состоят из непрерывной последовательности DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. Таким образом, полипептид согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (которая не включает непрерывную последовательность DDYQRNATEAYAKEVPHQIT). Первые двадцать остатков SEQ ID NO: 1 соответствуют положениям 35-54 SEQ ID NO:

5. Эта конкретная модификация может быть обозначена в настоящем документе термином «D35_T54del». Таким образом, поскольку в SEQ ID NO: 2 отсутствует N-концевой метионин, сигнальная последовательность из 33 аминокислот SEQ ID NO: 5 и, кроме того, имеется делеция последовательности DDYQRNATEAYAKEVPHQIT, соответствующей положениям 35-54 SEQ ID NO: 5, остаток серина (S) на N-конце SEQ ID NO: 2 обозначается как положение 55, как соответствующее положение в SEQ ID NO: 5.

Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предложен полипептид, обладающий активностью цистеин-протеазы IgG и содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая представляет собой:

(i) SEQ ID NO: 1; или

(ii) SEQ ID NO: 2; или

(iii) вариант SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, который имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 соответственно, при условии, что последовательность сохраняет: (а) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 95 SEQ ID NO: 5, (b) аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует положению 99 SEQ ID NO: 5, и (с) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 226 SEQ ID NO: 5, и при условии, что полипептид по меньшей мере столь же эффективен в расщеплении IgG человека, как и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2 соответственно, при измерении в том же анализе.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, вектору экспрессии или клетке-хозяину, кодирующей или экспрессирующей полипептид согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного антителами IgG, у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества полипептида согласно настоящему изобретению. Способ обычно может включать многократное введение указанного полипептида субъекту.

Настоящее изобретение также относится к способу обработки *ex vivo* крови, взятой у пациента, как правило, пациента, страдающего заболеванием или состоянием, опосредованным антителами IgG, причем этот способ включает приведение крови в контакт с полипептидом согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен способ увеличения пользы терапии или терапевтического средства для субъекта, причем способ включает (а) введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению; и (b) последующее

введение указанной терапии или указанного терапевтического агента субъекту; причем:

- указанная терапия представляет собой трансплантацию органа или указанное терапевтическое средство представляет собой антитело, генную терапию, такую как вирусный вектор, замену дефектного эндогенного фактора, такого как фермент, фактор роста или свертывания крови, или клеточную терапию;

- количество вводимого полипептида достаточно для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта; и

- стадии (a) и (b) разделены временным интервалом, достаточным для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу получения Fc-, Fab- или F(ab')₂-фрагментов IgG, включающему приведение IgG в контакт с полипептидом согласно настоящему изобретению, предпочтительно *ex vivo*.

Также предусмотрены наборы для осуществления способов согласно настоящему изобретению.

Краткое описание графических материалов

На Фигуре 1 показан SDS-PAGE анализ экспрессии и очистки pCART239 (SEQ ID NO: 1 с N-концевой Met и C-концевой His-меткой). (A) Сверхэкспрессия pCART239 - на полосах 1 и 2 показаны лизаты, полученные из клеток, собранных через 1 час после индукции IPTG; полоса 3 показывает объединенные лизаты. (B) Очистка pCART239 - полоса 1 показывает протекание процесса очистки NiNTA, демонстрирующее удаление примесей, наблюдаемых в лизате, полосы 2 и 3 представляют собой очищенный pCART239 (~ 0,5 мкг и ~ 3,0 мкг загруженного белка, соответственно).

На Фигуре 2 показаны результаты репрезентативных гелей SDS-PAGE, использованных для визуализации продуктов расщепления, полученных путем инкубации IgG1 (Humira) с IdeS и протестированными вариантами IdeZ, как указано. Концентрации над полосами указывают концентрацию тестируемого варианта IdeS/IdeZ. Панели A и B представляют собой два отдельных эксперимента.

На Фигуре 3 показаны результаты репрезентативных гелей SDS-PAGE, использованных для визуализации продуктов расщепления, полученных путем инкубации IgG2 (XGEVA) с IdeS и протестированными вариантами IdeZ, как указано. Концентрации над полосами указывают концентрацию тестируемого варианта IdeS/IdeZ. Панели A и B представляют собой два отдельных эксперимента.

На Фигуре 4 показаны результаты репрезентативных гелей SDS-PAGE, использованных для визуализации продуктов расщепления, полученных при инкубации: (A) IgG1 (Humira); (B) IgG2 (XGEVA); (C) IgG3; (D) IgG4 с IdeS и N240, как
5 IdeS/IdeZ.

На Фигуре 5 показана кривая титрования по экспериментальным точкам средних значений электрохемилюминесценции (ECL) из трех образцов в анализе для определения активности (эффективности при расщеплении IgG1) N240 по сравнению с IdeS. Столбики погрешностей представляют SD.

10 На Фигуре 6 показано расщепление сывороточного IgG с помощью pCART239 с ловушкой и без нее (неактивная версия pCART239). Использование ловушки может уменьшить ингибирующее действие ADA, присутствующей в сыворотке. Концентрации над полосами указывают концентрацию тестируемого варианта IdeZ.

15 На Фигуре 7 показана кривая титрования по экспериментальным точкам средних значений электрохемилюминесценции (ECL) из трех образцов и двух отдельных серий разведений в анализе для определения активности N240 и IdeS в сыворотке (эффективность при расщеплении IgG). Столбики погрешностей представляют SD.

20 На Фигуре 8 показаны средние значения ECL, соответствующие уровням ранее существовавших N240 и IdeS ADA в сыворотке 40 здоровых людей и в одном нормальном пуле сыворотки (n = 100).

На Фигуре 9 показано схематическое изображение постадийного расщепления IgG полипептидами согласно настоящему изобретению.

25 Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность полипептида согласно настоящему изобретению.

30 **SEQ ID NO: 2** представляет собой последовательность еще одного полипептида согласно настоящему изобретению, которая является родственной SEQ ID NO: 1 и идентичной SEQ ID NO: 1, за исключением делеции первых 20 аминокислот на N-конце SEQ ID NO: 1, соответствующих непрерывной последовательности DDYQRNATEAYAKEVPHQIT.

SEQ ID NO: 3 представляет собой зрелую последовательность IdeZ, в которой отсутствуют N-концевой метионин и сигнальная последовательность.

35 **SEQ ID NO: 4** представляет собой зрелую последовательность IdeS, в которой отсутствуют N-концевой метионин и сигнальная последовательность. Также раскрыта под номером доступа Genbank ADF13949.1.

SEQ ID NO: 5 представляет собой полную последовательность IdeZ, включающую N-концевой метионин и сигнальную последовательность. Также раскрыта как эталонная последовательность NCBI № WP_014622780.1.

5 **SEQ ID NO: 6** представляет собой полную последовательность IdeS, включающую N-концевой метионин и сигнальную последовательность. Также раскрыта как эталонная последовательность NCBI № WP_010922160.1.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность pCART207, варианта полипептида IdeZ.

10 **SEQ ID NO: 8** представляет собой последовательность pCART229, варианта полипептида IdeZ.

SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность pCART239, варианта полипептида IdeZ согласно настоящему изобретению, которая родственна SEQ ID NO: 1 присутствием дополнительного N-концевого метионина и дополнительной C-концевой гистидиновой метки (с глициновым линкером).

15 **SEQ ID NO: 10** представляет собой последовательность N240, варианта полипептида IdeZ согласно настоящему изобретению, которая родственна SEQ ID NO: 1 наличием дополнительного N-концевого метионина.

20 **SEQ ID NO: 11** представляет собой последовательность pCART242, варианта полипептида IdeZ согласно настоящему изобретению, которая родственна SEQ ID NO: 2 наличием дополнительного N-концевого метионина и дополнительной C-концевой гистидиновой метки (с глициновым линкером).

SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность pCART243, неактивного варианта полипептида IdeZ.

25 **SEQ ID NO: 13** представляет собой последовательность контрольного полипептида IdeS. Содержит последовательность SEQ ID NO: 4 с дополнительным N-концевым метионином и гистидиновой меткой (с глициновым линкером) (внутренняя ссылка pCART124).

30 **SEQ ID NO: 14** представляет собой последовательность контрольного полипептида IdeZ. Содержит последовательность SEQ ID NO: 3 с дополнительным N-концевым метионином и гистидиновой меткой (с глициновым линкером) (внутренняя ссылка pCART144).

SEQ ID NO: 15 представляет собой непрерывную последовательность DDYQRNATEAYAKEVPHQIT, которая соответствует положениям 35-54 SEQ ID NO: 5.

35 **SEQ ID NO: 16-23** представляют собой нуклеотидные последовательности, кодирующие определенные полипептиды, описанные в настоящем документе.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что различные применения раскрытых продуктов и способов могут быть адаптированы к конкретным потребностям в данной области техники. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения.

Кроме того, как используется в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в содержании явно не указано иное. Так, например, ссылка на «полипептид» включает «полипептиды» и т.п.

«Полипептид» используется в настоящем документе в самом широком смысле для обозначения соединения двух или более субъединичных аминокислот, аналогов аминокислот или других пептидомиметиков. Таким образом, термин «полипептид» включает короткие пептидные последовательности, а также более длинные полипептиды и белки. Используемый в настоящем документе термин «аминокислота» относится либо к природным и/или не природным, либо к синтетическим аминокислотам, включая как D-, так и L-оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и обычно относятся к человеку. Ссылки на IgG обычно относятся к IgG человека, если не указано иное.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе выше или ниже, настоящим полностью включены посредством ссылки.

Функциональные особенности полипептида

Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, обладающему активностью цистеин-протеазы IgG, при этом указанный полипептид более эффективен в расщеплении IgG человека, чем IdeZ. Активность цистеин-протеазы IgG в отношении IgG человека у полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно является по меньшей мере такой же высокой, как активность цистеин-протеазы IgG в отношении IgG IdeS человека. Кроме того, полипептид согласно настоящему изобретению обычно является менее иммуногенным, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ. В контексте контроля или сравнения полипептида согласно настоящему изобретению «IdeS» и «IdeZ» относятся к полипептиду, состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 и 3 соответственно. В качестве альтернативы или в дополнение, «IdeS» и «IdeZ» при использовании в качестве контроля или сравнения могут относиться к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и 3

соответственно, с дополнительным остатком метионина (M) на N-конце и/или меткой на C-конце для облегчения экспрессии и выделения из стандартных бактериальных систем экспрессии. Подходящие метки включают гистидиновую метку, которая может быть присоединена непосредственно к C-концу полипептида или присоединена опосредованно с помощью любой подходящей линкерной последовательности, такой как 3, 4 или 5 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести остатков гистидина, хотя она может быть длиннее, обычно до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот или короче, например, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислота. Последовательность типичного полипептида IdeS, используемого в настоящем документе в качестве контроля, представлена как SEQ ID NO: 13. Этот полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 4 с дополнительным N-концевым метионином и гистидиновой меткой и может обозначаться в настоящем документе как pCART124. Последовательность типичного полипептида IdeZ, используемого в настоящем документе в качестве контроля, представлена как SEQ ID NO: 14. Этот полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 3 с дополнительным N-концевым метионином и гистидиновой меткой и может обозначаться в настоящем документе как pCART144.

Активность цистеин-протеазы IgG можно оценить любым подходящим способом, например, путем инкубации полипептида с образцом, содержащим IgG, и определения присутствия продуктов расщепления IgG. Эффективность можно оценивать в присутствии или в отсутствие ингибитора, такого как нейтрализующее антитело. Однако эффективность в настоящем документе обычно означает эффективность, оцененную в отсутствие такого ингибитора, если не указано иное. Подходящие способы описаны в примерах. Эффективность полипептида при расщеплении IgG может упоминаться в настоящем документе как «активность» полипептида. Активность полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза выше, чем активность IdeZ, измеренная в том же анализе. Активность полипептида согласно настоящему изобретению может быть по меньшей мере в 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 7,5 раз или 8,0 раз выше, чем активность IdeZ, измеренная в том же анализе. В качестве альтернативы или в дополнение активность полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере эквивалентна активности IdeS, измеренной в том же анализе. В качестве альтернативы или в дополнение активность полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно выше активности IdeS, измеренной в том же анализе. Активность полипептида согласно настоящему изобретению может быть по меньшей мере в 1,1 раза, 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, 2,5 раза, 3,0 раза, 4,0 раза больше, чем активность IdeS, измеренная в том же

анализе. Активность полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 3,0 или по меньшей мере в 4,0 раза выше, чем активность IdeS, измеренная в том же анализе.

5 Полипептид согласно настоящему изобретению обычно является менее иммуногенным, чем IdeS, и поэтому повышенная активность по сравнению с активностью IdeZ и/или активностью, эквивалентная активности IdeS, является приемлемым минимальным стандартом активности цистеин-протеазы в отношении IgG человека. Однако повышенная активность по сравнению с IdeS является
10 желательным улучшением. Такая повышенная активность, как правило, позволяет использовать более низкую дозу полипептида согласно настоящему изобретению для достижения того же терапевтического эффекта, что и более высокая доза IdeS. Более низкая доза может также позволить большее количество повторных введений полипептида согласно настоящему изобретению по сравнению с IdeS. Это связано с
15 тем, что использование более низкой дозы уменьшает проблемы, связанные с иммуногенностью терапевтического агента, поскольку иммунная система с меньшей вероятностью ответит или будет менее энергично реагировать на агент, который присутствует в более низкой концентрации.

Анализы для оценки эффективности полипептида при расщеплении IgG, то
20 есть анализы для оценки активности полипептида, хорошо известны в данной области техники, и можно использовать любой подходящий анализ. Подходящие анализы включают анализ на основе ELISA, такой как описанный в примерах. В таком анализе лунки планшета для анализа обычно покрывают антителом-мишенью, таким как бычий сывороточный альбумин (BSA). Затем в лунки добавляют образцы тестируемого
25 полипептида, а затем образцы антитела, специфичного к мишени, которое в этом примере является антителом, специфичным к BSA (и которое чувствительно к расщеплению IdeS). Полипептиду и антителу позволяют взаимодействовать в условиях, подходящих для активности цистеиновой протеазы IgG. После подходящего интервала планшет для анализа промывают и добавляют детекторное антитело,
30 которое специфически связывается с Fc-областью антитела, специфичного для мишени, в условиях, подходящих для связывания с антителом, специфичным для мишени. Детекторное антитело будет связываться с Fc-областью любого интактного антитела, специфичного для мишени, которое связалось с мишенью в каждой лунке. После промывки количество детекторного антитела, присутствующего в лунке, будет
35 пропорционально количеству специфичного для мишени антитела, связанного с этой лункой. Детекторное антитело может быть прямо или косвенно конъюгировано с меткой или другой репортерной системой (такой как фермент), так что можно

определить количество детекторного антитела, оставшегося в каждой лунке. Чем выше активность тестируемого полипептида, который был в лунке, тем меньше останется интактных антител, специфичных для мишени, и, следовательно, будет меньше детекторных антител. Как правило, по меньшей мере одна лунка на данном планшете для анализа будет включать IdeS вместо тестируемого полипептида, так что 5 активность тестируемых полипептидов можно будет непосредственно сравнить с активностью IdeS. IdeZ или известный вариант IdeZ также могут быть включены для сравнения.

Другие анализы могут определять активность тестируемого полипептида путем 10 прямой визуализации и/или количественного определения фрагментов IgG, которые образуются в результате расщепления IgG тестируемым полипептидом. Анализ этого типа также описан в примерах. В таком анализе образец IgG обычно инкубируют с тестируемым полипептидом (или с одним или более IdeS, IdeZ и известным вариантом IdeZ в качестве контроля) при различных концентрациях в серии титрования. 15 Продукты, полученные в результате инкубации при каждой концентрации, затем разделяют с помощью гель-электрофореза, например, с помощью SDS-PAGE. Целый IgG и фрагменты, полученные в результате расщепления IgG, затем можно идентифицировать по размеру и количественно оценить по интенсивности окрашивания подходящим красителем. Чем больше количество фрагментов 20 расщепления, тем выше активность тестируемого полипептида при данной концентрации. Полипептид согласно настоящему изобретению, как правило, будет продуцировать обнаруживаемые количества фрагментов расщепления при более низкой концентрации (нижняя точка в серии титрования), чем IdeZ и/или IdeS. Этот тип анализа также может позволить идентифицировать тестируемые полипептиды, 25 которые более эффективно расщепляют первую или вторую тяжелую цепь молекулы IgG, поскольку также можно определить количество различных фрагментов, образующихся в результате каждого события расщепления. Образцы IgG, подходящие для описанных в настоящем документе анализов активности, могут быть получены из различных источников. Например, можно использовать коммерческие препараты 30 антител. Коммерческие препараты антител обычно являются чистыми и специфичными по изотипу и подклассу. В качестве альтернативы можно использовать образец, содержащий смешанные популяции IgG, например сыворотку человека. Образцы сыворотки, содержащие IgG, могут содержать ADA против IdeS и/или IdeZ. Таким образом, образцы IgG, подходящие для описанных в настоящем документе 35 анализов активности, могут содержать ADA. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным (по сравнению с IdeS и/или IdeZ) при расщеплении первой цепи молекулы IgG, чем второй цепи (см. схематическое

изображение на Фигуре 9), особенно когда IgG представляет собой изотип IgG2. В качестве альтернативы, полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным (по сравнению с IdeS и/или IdeZ) при расщеплении второй цепи молекулы IgG, чем второй цепи (см. схематическое изображение на Фигуре 9),
5 особенно когда IgG представляет собой изотип IgG1. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть более эффективным (по сравнению с IdeS и/или IdeZ) в расщеплении IgG1, чем IgG2.

Этот тип анализа также может быть адаптирован для определения степени, в которой присутствие IdeS-специфичной ADA может снижать активность полипептида
10 согласно настоящему изобретению. В адаптированном анализе, когда образец IgG инкубируют с тестируемым полипептидом (или с IdeS в качестве контроля), в реакционную среду включают сыворотку или препарат IVIg, содержащий IdeS-специфические ADA. Предпочтительно активность полипептида согласно настоящему изобретению не зависит от присутствия ADA или снижается в меньшей степени в
15 присутствии ADA, чем активность IdeS в том же анализе. Другими словами, предпочтительно, чтобы нейтрализующий эффект IdeS-специфичных ADA на полипептид согласно настоящему изобретению был таким же или ниже, чем нейтрализующий эффект IdeS-специфичных ADA на IdeS, измеренный в том же анализе.

Как указано выше, полипептид согласно настоящему изобретению обычно является менее иммуногенным, чем IdeS. То есть полипептид согласно настоящему изобретению может вызывать такой же или предпочтительно более низкий иммунный
20 ответ, чем IdeS, когда присутствует в эквивалентной дозе или концентрации и измеряется в том же анализе. Иммуногенность полипептида согласно настоящему изобретению обычно составляет не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30% или не более 25% от иммуногенности IdeS, измеренной в том же анализе. Предпочтительно иммуногенность полипептида согласно настоящему изобретению составляет не более 25% от иммуногенности IdeS, измеренной в том же анализе.

Анализы для оценки иммуногенности полипептида также хорошо известны в данной области техники, и можно использовать любой подходящий анализ. Предпочтительные анализы для оценки иммуногенности полипептида относительно иммуногенности IdeS включают оценку степени, в которой ADA, специфичные для IdeS, также связываются с полипептидом согласно настоящему изобретению. Анализы
30 этого типа описаны в примерах. Присутствие и количество IdeS-специфичных молекул ADA у пациента можно определить любым подходящим способом, таким как

специфичный для агента тест CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ титра, проводимый в образце сыворотки пациента.

Один из таких анализов включает тестирование на конкуренцию между IdeS и тестируемым полипептидом за связывание с IdeS-специфическими ADA. Как правило, лунки планшета для анализа покрывают IdeS с последующим введением предварительно инкубированной смеси раствора, содержащего IdeS-специфические ADA, например, препарат IVIg и тест-полипептид (или IdeS в качестве контроля). Предварительную инкубацию проводят в присутствии ингибитора активности цистеин-протеазы IgG, т.е. йодоуксусной кислоты (IHAc) и при высокой концентрации соли, так что допускается только высокоаффинное связывание между белком и ADA. Предварительно инкубированной смеси позволяют взаимодействовать с лунками, покрытыми IdeS. Любые IdeS-специфичные ADA, не связанные с тестируемым полипептидом, будут связываться с IdeS в лунках. После подходящего интервала планшет для анализа промывают и добавляют детекторное антитело, которое специфически связывается с IgG, в условиях, подходящих для связывания. Детекторное антитело будет связываться с любыми ADA, которые связались с IdeS в каждой лунке. После промывки количество детекторного антитела, присутствующего в лунке, будет обратно пропорционально количеству ADA, которые связались с тестируемым полипептидом. Детекторное антитело может быть прямо или косвенно конъюгировано с меткой или другой репортерной системой (такой как фермент), так что можно определить количество детекторного антитела, оставшегося в каждой лунке. Как правило, по меньшей мере одну лунку на данном планшете для анализа тестируют с предварительно инкубированной смесью IVIg и IdeS вместо тестируемого полипептида, так что связывание ADA с тестируемыми полипептидами можно непосредственно сравнить со связыванием с IdeS. IdeZ также может быть включен в качестве дополнительного контроля.

Другой подходящий анализ включает тестирование степени, с которой серия титрования различных концентраций IdeS-специфичных ADA, например, препарат IVIg, связывается с тестируемым полипептидом по сравнению с IdeS и/или IdeZ в качестве контроля. Предпочтительно полипептид согласно настоящему изобретению требует более высокой концентрации ADA для обнаружения связывания по сравнению с концентрацией ADA, при которой можно обнаружить связывание с IdeS. Такой анализ описан в примерах. Такой анализ обычно включает покрытие лунок планшета для анализа тестируемым полипептидом или контролем с последующей инкубацией каждой лунки с различной концентрацией IdeS-специфичных ADA из серии титрования. Инкубации проводят в присутствии ингибитора активности цистеин-протеазы IgG, т.е. йодоуксусной кислоты (IHAc) и при высокой концентрации соли, так

что допускается только высокоаффинное связывание между белком и ADA. После подходящего интервала планшет для анализа промывают и добавляют детекторное антитело, которое специфически связывается с F(ab')₂ IgG, в условиях, подходящих для связывания. Детекторное антитело будет связываться с любыми ADA, которые связались с тестируемым полипептидом или IdeS, покрытым в каждой лунке. После промывки количество детекторного антитела, присутствующего в лунке, будет прямо пропорционально количеству ADA, которое связалось с тестируемым полипептидом или контролем. Детекторное антитело может быть прямо или косвенно конъюгировано с меткой или другой репортерной системой (такой как фермент), так что можно определить количество детекторного антитела, оставшегося в каждой лунке. По меньшей мере, одна лунка на данном планшете для анализа будет инкубирована с буфером, не содержащим ADA, в качестве холостой пробы, чтобы установить пороговый уровень для обнаружения связывания в тестовых лунках.

15 Структурные особенности полипептида

В этом разделе изложены структурные признаки полипептида согласно настоящему изобретению, которые применяются в дополнение к функциональным признакам, изложенным в предыдущем разделе.

Полипептид согласно настоящему изобретению обычно имеет длину по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или 310 аминокислот. Длина полипептида согласно настоящему изобретению обычно не превышает 400, 350, 340, 330, 320 или 315 аминокислот. Следует понимать, что любой из перечисленных выше нижних пределов может быть объединен с любым из перечисленных выше верхних пределов, чтобы обеспечить диапазон длины полипептида согласно настоящему изобретению. Например, длина полипептида может составлять от 100 до 400 аминокислот или от 250 до 350 аминокислот. Полипептид предпочтительно имеет длину от 290 до 320 аминокислот, наиболее предпочтительно от 300 до 315 аминокислот.

Первичная структура (аминокислотная последовательность) полипептида согласно настоящему изобретению представляет собой SEQ ID NO: 1, который представляет собой специфический вариант, основанный на зрелой последовательности IdeZ дикого типа (SEQ NO: 3). Другими словами, SEQ ID NO: 1 связана с SEQ ID NO: 3 посредством определенного набора точечных мутаций в первичной полипептидной последовательности (по сравнению с SEQ ID NO: 3), которые ответственны за его повышенную активность в отношении IgG человека.

Другим полипептидом согласно настоящему изобретению является SEQ ID NO: 2, родственная SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 идентична SEQ ID NO: 1, за исключением

делеции первых 20 аминокислот на N-конце SEQ ID NO: 1, соответствующей непрерывной последовательности DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. Другими словами, SEQ ID NO: 2 также идентична SEQ ID NO: 1 в отношении точечных мутаций в первичной полипептидной последовательности относительно последовательности IdeZ дикого типа (SEQ ID NO: 3).

Настоящее изобретение также относится к варианту SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, который имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 соответственно, при условии, что последовательность сохраняет: (a) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 95 SEQ ID NO: 5, (b) аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует положению 99 SEQ ID NO: 5, и (c) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 226 SEQ ID NO: 5, и при условии, что полипептид по меньшей мере столь же эффективен в расщеплении IgG человека, как и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2 соответственно, при измерении в том же анализе. Необязательно одна или более аминокислотных модификаций в варианте SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 не приводят к той же самой аминокислоте, которая присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3, предпочтительно, при этом все модификации не приводят к той же самой аминокислоте, которая присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3.

Если последовательность полипептида согласно настоящему изобретению содержит вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, таких как добавления аминокислот, делеции или замены, сделаны относительно последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, последовательность должна содержать: (a) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 95 SEQ ID NO: 5, (b) аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует положению 99 SEQ ID NO: 5, и (c) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 226 SEQ ID NO: 5. В противном случае модификации предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Варианты аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 могут содержать одну или более модификаций (сделанных относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 соответственно), которые не приводят к получению одной и той же аминокислоты, как присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3. Предпочтительно в вариантах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 все модификации (сделанные относительно SEQ ID NO: NO: 1 или SEQ ID NO: 2 соответственно) не приводят к той же аминокислоте,

которая присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3.

Консервативные замены заменяют аминокислоты другими аминокислотами с аналогичной химической структурой, аналогичными химическими свойствами и/или аналогичным объемом боковой цепи. Введенные аминокислоты могут иметь такую же полярность, гидрофильность, гидрофобность, основность, кислотность, нейтральность или заряд, что и аминокислоты, которые они заменяют. В качестве альтернативы, консервативная замена может включать другую аминокислоту, которая является ароматической или алифатической, вместо ранее существовавшей ароматической или алифатической аминокислоты. Консервативные замены аминокислот хорошо известны в данной области и могут быть выбраны в соответствии со свойствами 20 основных аминокислот, как определено в Таблице A1 ниже. Если аминокислоты имеют одинаковую полярность, это можно определить по шкале гидрофобности для боковых цепей аминокислот в таблице A2.

15 Таблица A1 - Химические свойства аминокислот

Ala (A)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met (M)	гидрофобная, нейтральная
Cys (C)	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn (N)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Asp (D)	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Pro (P)	гидрофобная, нейтральная
Glu (E)	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Gln (Q)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe (F)	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg (R)	полярная, гидрофильная, заряженная (+)
Gly (G)	алифатическая, нейтральная	Ser (S)	полярная, гидрофильная, нейтральная
His (H)	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Thr (T)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile (I)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Val (V)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная
Lys (K)	полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Trp (W)	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu (L)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr (Y)	ароматическая, полярная, гидрофобная

Таблица A2 - Шкала гидрофобности

	<u>Боковая цепь</u>	<u>Гидрофобность</u>
	Ile	4,5
20	Val	4,2
	Leu	3,8
	Phe	2,8
	Cys	2,5
	Met	1,9
25	Ala	1,8
	Gly	-0,4
	Thr	-0,7
	Ser	-0,8

	Trp	-0,9
	Tyr	-1,3
	Pro	-1,6
	His	-3,2
5	Glu	-3,5
	Gln	-3,5
	Asp	-3,5
	Asn	-3,5
	Lys	-3,9
10	Arg	-4,5

Некоторые остатки (кроме положений 95, 99 и 226, соответствующих SEQ ID NO: 5) в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 предпочтительно сохраняются в пределах вариантной последовательности, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот. Например, указанный вариант последовательности обычно сохраняет определенные остатки, которые, как известно, необходимы для активности цистеин-протеазы IgG. Таким образом, цистеин, соответствующий положению 102 SEQ ID NO: 5, должен быть сохранен в аминокислотной последовательности полипептида согласно настоящему изобретению. Необязательно лизин (K), соответствующий положению 92 SEQ ID NO: 5, гистидин (H), соответствующий положению 272 SEQ ID NO: 5, и аспарагиновая кислота (D), соответствующая каждому из положений 294 и 296 последовательности SEQ ID NO: 5, также сохранены. Таким образом, вариант полипептида с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 согласно настоящему изобретению обычно имеет цистеин (C) в положении, которое соответствует положению 102 SEQ ID NO: 5; и необязательно содержит в положениях, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 SEQ ID NO: 5, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно.

Авторы настоящего изобретения также определили, что некоторые другие модификации последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 могут повышать активность полипептида согласно настоящему изобретению и/или могут снижать распознавание полипептида согласно настоящему изобретению с помощью IdeS-специфичных ADA. Таким образом, вариант полипептида SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную замену, осуществленную в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положениях, соответствующих положениям 84, 93, 97, 137, 139, 140, 147, 150, 162, 165, 166, 171, 174, 205, 226, 237, 239, 243, 250, 251, 254, 255, 282, 288, 312, 315, 347, 349 SEQ ID NO: 5.

Замены обычно заменяют существующую аминокислоту другой аминокислотой, имеющей другие свойства. Например, незаряженная аминокислота может быть заменена заряженной аминокислотой и наоборот. Предпочтительные замены в этих положениях указаны в Таблице В ниже с использованием однобуквенного кода:

Таблица В

Существующая аминокислота в SEQ ID NO: 1 или 2	Положение, соответствующее SEQ ID NO: 5	Предпочтительная замена
H	84	N
A	93	T
K	97	A
F	137	I
N	139	R/K
Q	140	E
A	147	E
D	150	R
N	162	E
R	165	K
D	166	E
N	171	Y
A	174	T
N	205	K
L	237	F
N	239	E
N	243	K
K	250	S
Q	251	E
T	254	E
E	255	K
N	282	D
E	288	K
A	312	K
H	315	K
K	347	Q
S	349	N

Каждая из замен может быть обозначена в настоящем документе с использованием термина, полученного путем объединения записей в первом, втором и третьем столбцах для каждой строки слева направо. Например, замена в первой строке таблицы В может обозначаться в настоящем документе как «H84N», замена во второй строке может обозначаться как «A93T» и так далее. 7

В приведенной ниже таблице С обобщены изменения, осуществленные по отношению к последовательности IdeZ дикого типа (SEQ ID NO: 3) для получения аминокислотных последовательностей некоторых полипептидов, описанных в настоящем документе. 10

Таблица С

Внутренняя ссылка	Модификации относительно IdeZ (SEQ ID NO: 3) (положения, соответствующие SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO полной последовательности

pCART207	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	7
pCART229	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	8
pCART239/N240	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, D95N, N99D, N138R, D226N	9 (pCART239); 10 (N240)
pCART242	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, D95N, N99D, N138R, D226N	11

Аминокислотные последовательности некоторых полипептидов, упомянутых в настоящем документе, полностью воспроизведены ниже.

5 **SEQ ID NO: 1**

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNGK
 DDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLCAAIDTKDSQTN
 10 LFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDA
 VFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNA
 EGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQ
 KLS

SEQ ID NO: 2

SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFD
 15 QNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLCAAIDTKDSQTNSQLFNFRDKAFPNSARQLGV
 MPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNK
 GLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMK
 KYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

20 **SEQ ID NO: 3(зрелая последовательность IdeZ)**

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFD
 GKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLCAAIDTKDSQTN
 25 SQLFNFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIF
 DAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADF
 NAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDI
 WQKLS

SEQ ID NO: 4(зрелая последовательность IdeS)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGK
 30 DDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLD
 SKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAV
 FTRGDQSKLLTSRHFDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSN
 GNLKAIYVTSDSDSNASIGMKKYFVGNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWN
 QTN

35

SEQ ID NO: 5(полная последовательность IdeZ)

MKTIAYPNKP HSLSAGLLTAIAIFSLASSNITYADDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTP
 LTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFD GKDNDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIE
 40 AYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLCAAIDTKDSQTNSQLFNFRDKAFPNSARQLGVMPDLVL
 DMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDIS
 TIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTSDANASIGMKKYFVGI
 NAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 6 (полная последовательность IdeS)

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSF SANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPAN
 45 FTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEE
 HPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLD SKLFEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFIN

GYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELT
EGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSDSNGLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGV
NSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

5 **SEQ ID NO: 7 (pCART207)**

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNS
QLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFD
AVFTRGDQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN
10 AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIW
QKLS

SEQ ID NO: 8 (pCART229)

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
15 KDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNS
QLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFD
AVFTRGNQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN
AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIW
20 QKLS

SEQ ID NO: 9 (pCART239)

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNG
KDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNS
QLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFD
25 AVFTRGNQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN
AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIW
QKLSGGGHHHHHH

SEQ ID NO: 10 (N240)

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNG
30 KDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNS
QLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFD
AVFTRGNQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN
AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIW
35 QKLS

SEQ ID NO: 11 (pCART242)

MSWWTGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWF
DQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLG
40 VMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKN
KGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGM
KKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLSGGGHHHHHH

SEQ ID NO: 12 (pCART243 – неактивный вариант IdeZ)

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFNG
45 KDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNS
QLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFD
AVFTRGNQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIHKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN
AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIW
50 QKLSGGGHHHHHH

Полипептид согласно настоящему изобретению может содержать, по существу состоять или состоять из последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Каждая из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 может необязательно включать дополнительный

метионин на N-конце и/или гистидиновую метку на C-конце. Гистидиновая метка предпочтительно состоит из шести остатков гистидина. Гистидиновая метка предпочтительно связана с C-концом линкером из 3-х или 5-ти глициновых остатков.

В соответствующих случаях идентичность аминокислот можно рассчитать с использованием любого подходящего алгоритма. Например, алгоритмы PILEUP и BLAST можно использовать для вычисления идентичности или выравнивания последовательностей (например, для идентификации эквивалентных или соответствующих последовательностей (обычно с их настройками по умолчанию), например, как описано в Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) *J Mol Biol* 215:403-10. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST находится в открытом доступе через Национальный центр биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данный алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) путем идентификации коротких «слов» длины W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторой положительной пороговой оценке T при выравнивании со «словом» такой же длины в последовательности из базы данных. T называется порогом показателя сходства соседних слов (Altschul *et al*, *supra*). Эти первоначальные сходства соседних «слов» играют роль затравок для инициирования поисков с целью обнаружения HSP, содержащих их. Совпадения слов продлевают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока суммарный балл выравнивания может увеличиваться. Совпадения слов прекращают продлевать в каждом направлении, если: суммарный балл выравнивания снижается на величину X от максимальной достигнутой им величины; суммарный балл опускается до нуля или ниже, вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательными баллами или достигается конец любой последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLAST в качестве параметров по умолчанию используются длина слова (W), равная 11, матрица подсчета баллов BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919), выравнивания (B), равные 50, ожидание (E), равное 10, $M = 5$, $N = 4$ и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями; см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Один критерий сходства, предоставляемый алгоритмом BLAST, представляет собой вероятность наименьшей суммы ($P(N)$), который является показателем вероятности, с которой совпадение между двумя полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями произошло бы случайно. Например,

последовательность считают сходной с другой последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении первой последовательности со второй последовательностью меньше примерно 1, предпочтительно меньше примерно 0,1, более предпочтительно меньше примерно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше примерно 0,001. В качестве альтернативы, пакет UWGCG предоставляет программу BESTFIT, которую можно использовать для расчета идентичности (например, использовать при настройках по умолчанию) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395).

10 *Получение полипептидов*

Полипептид, описанный в настоящем документе, может быть получен любым подходящим способом. Например, полипептид может быть синтезирован непосредственно с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, таких как твердофазная химия Fmoc, твердофазная химия Boc или синтез пептида в растворе. В качестве альтернативы, полипептид может быть получен путем трансформации клетки, обычно бактериальной клетки, молекулой нуклеиновой кислоты или вектором, кодирующим указанный полипептид. Получение полипептидов путем экспрессии в бактериальных клетках-хозяевах описано ниже и проиллюстрировано в примерах. Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот и векторам, которые кодируют полипептид согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей такую нуклеиновую кислоту или вектор. Типичные полинуклеотидные молекулы, кодирующие полипептиды согласно настоящему изобретению и другие полипептиды, раскрытые в настоящем документе, представлены как SEQ ID NO: 16-23. Каждая из этих последовательностей включает на 5'-конце кодон для N-концевого метионина (ATG) и, перед стоп-кодоном (TAA) на 3'-конце, кодоны для линкера 3x Gly и гистидиновой метки 6x His, которые могут быть необязательно исключены.

Термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, информационную РНК (мРНК), кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид согласно настоящему изобретению может быть предложен в выделенной или по существу выделенной форме. Под «по существу выделенный» подразумевается, что полипептид может быть существенно, но не полностью выделен

из любой окружающей среды. Полинуклеотиды можно смешивать с носителями или разбавителями, которые не будут мешать их предполагаемому применению и при этом будут считаться по существу выделенными. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая «кодирует» выбранный полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo* при помещении под контроль соответствующих регуляторных последовательностей, например, в векторе экспрессии. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5'-конце (амино) и стоп-кодоном трансляции на 3'-конце (карбокси). Для целей настоящего изобретения такие последовательности нуклеиновых кислот могут включать, но не ограничиваются ими, кДНК из вирусной, прокариотической или эукариотической мРНК, геномные последовательности из вирусной или прокариотической ДНК или РНК и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность терминации транскрипции может быть расположена на 3' от кодирующей последовательности.

Полинуклеотиды могут быть синтезированы в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, как описано в качестве примера в Sambrook *et al.* (1989, Molecular Cloning - лабораторное руководство; Cold Spring Harbour Press). Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут быть предоставлены в форме кассеты экспрессии, которая включает контрольные последовательности, функционально связанные со встроенной последовательностью, что позволяет экспрессировать полипептид согласно настоящему изобретению *in vivo*. Эти кассеты экспрессии, в свою очередь, обычно содержатся в векторах (например, плаزمидях или рекомбинантных вирусных векторах). Такую кассету экспрессии можно вводить непосредственно субъекту-хозяину. В качестве альтернативы, вектор, содержащий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, может быть введен субъекту-хозяину. Предпочтительно полинуклеотид получают и/или вводят с использованием генетического вектора. Подходящим вектором может быть любой вектор, способный нести достаточное количество генетической информации и обеспечивающий экспрессию полипептида согласно настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение включает векторы экспрессии, которые содержат такие полинуклеотидные последовательности. Такие векторы экспрессии обычно создаются в области молекулярной биологии и могут, например, включать применение плазмидной ДНК и соответствующих инициаторов, промоторов, энхансеров и других элементов, таких как, например, сигналы полиаденилирования, которые могут быть необходимы и которые расположены в правильной ориентации, чтобы обеспечить экспрессию пептида согласно настоящему изобретению. Другие

подходящие векторы будут очевидны специалистам в данной области техники. В качестве дополнительного примера в этом отношении авторы настоящего изобретения ссылаются на Sambrook *et al.*

5 Настоящее изобретение также включает клетки, которые были модифицированы для экспрессии полипептида согласно настоящему изобретению. Такие клетки обычно включают прокариотические клетки, такие как бактериальные клетки, например *E.coli*. Такие клетки можно культивировать с применением обычных способов для получения полипептида согласно настоящему изобретению.

10 Полипептид может быть дериватизирован или модифицирован, чтобы облегчить его получение, выделение или очистку. Например, когда полипептид согласно настоящему изобретению получают путем рекомбинантной экспрессии в бактериальной клетке-хозяине, последовательность полипептида может включать дополнительный остаток метионина (M) на N-конце для улучшения экспрессии. В качестве другого примера полипептид согласно настоящему изобретению может быть 15 дериватизирован или модифицирован добавлением лиганда, который способен связываться непосредственно и специфически со средством разделения. В качестве альтернативы, полипептид может быть дериватизирован или модифицирован добавлением одного члена связывающей пары, а средства разделения включают реагент, который дериватизирован или модифицирован добавлением другого члена 20 связывающей пары. Может быть использована любая подходящая связывающая пара. В предпочтительном варианте осуществления, когда полипептид для применения в настоящем изобретении дериватизирован или модифицирован добавлением одного члена связывающей пары, полипептид предпочтительно является меченым гистидином или биотином. Обычно, кодирующая аминокислотная последовательность 25 гистидиновой или биотиновой метки, включается на уровне гена, и полипептид рекомбинантно экспрессируется в *E. coli*. Гистидиновая или биотиновая метка обычно присутствует на любом конце полипептида, предпочтительно на C-конце. Она может быть присоединена непосредственно к полипептиду или присоединена опосредованно с помощью любой подходящей линкерной последовательности, такой как 3, 4 или 5 30 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести остатков гистидина, хотя она может быть длиннее, обычно до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот, или короче, например, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислота.

Аминокислотная последовательность полипептида может быть 35 модифицирована для включения не встречающихся в природе аминокислот, например, для повышения стабильности. Когда полипептиды получают синтетическим путем, такие аминокислоты можно вводить во время получения. Полипептиды также могут быть модифицированы либо синтетическим, либо рекомбинантным способом.

Полипептиды также могут быть получены с использованием D-аминокислот. В таких случаях аминокислоты будут связаны в обратной последовательности в ориентации от С к N. Это общепринято в данной области техники для получения таких полипептидов.

- 5 Ряд модификаций боковых цепей известен в данной области техники, и они могут быть сделаны в боковых цепях полипептидов, при условии, что полипептиды сохраняют любую дополнительную требуемую активность или характеристику, как может быть указано в настоящем документе. Также будет понятно, что полипептиды могут быть химически модифицированы, т.е. посттрансляционно модифицированы.
- 10 Например, они могут быть гликозилированы, фосфорилированы или содержать модифицированные аминокислотные остатки.

- Полипептид может быть пегилирован. Полипептид согласно настоящему изобретению может быть по существу в выделенной форме. Его можно смешивать с носителями или разбавителями (как обсуждается ниже), которые не будут мешать
- 15 предполагаемому применению и при этом будут считаться по существу выделенными. Он также может быть по существу очищенной форме, и в этом случае он обычно будет содержать по меньшей мере 90%, т.е. по меньшей мере 95%, 98% или 99% белка в препарате.

20 *Композиции и составы, содержащие полипептиды*

- В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим полипептид согласно настоящему изобретению. Например, в настоящем изобретении предложена композиция, включающая один или более полипептидов согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически
- 25 приемлемый носитель или разбавитель. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами композиции и не является вредным для субъекта, которому вводят композицию. Как правило, носители и конечная композиция являются стерильными и апирогенными.

- Приготовление подходящей композиции может быть осуществлено с
- 30 применением стандартных химических составов и методологий фармацевтических составов, которые легко доступны квалифицированному специалисту в данной области техники. Например, агент можно комбинировать с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты,
- 35 вещества, регулирующие рН, восстанавливающие агенты и т.п., могут присутствовать во вспомогательном веществе или носителе. Подходящие восстановители включают цистеин, тиоглицерин, тиоредукцин, глутатион и т.п. Вспомогательные вещества,

носители и вспомогательные вещества, как правило, представляют собой фармацевтические агенты, которые не вызывают иммунного ответа у индивидуума, получающего композицию, и которые можно вводить без чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, жидкости, такие как вода, физиологический раствор, полиэтиленгликоль, гиалуроновая кислота, глицерин, тиоглицерин и этанол. Сюда также могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, носителей и вспомогательных веществ доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Составы для инъекций могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Композиции включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые составы с замедленным высвобождением или биоразлагаемые составы. Такие композиции могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления композиции парентерального введения активный ингредиент представлен в сухой (т.е. порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники и могут содержать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в настоящем документе. Такие стерильные составы для инъекций могут быть приготовлены с использованием нетоксичного парентерально приемлемого разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничиваются ими, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды.

Другие пригодные для парентерального введения композиции включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомальном препарате или в качестве компонента биоразлагаемой полимерной системы. Композиции для пролонгированного высвобождения или имплантации могут
5 содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, умеренно растворимый полимер или умеренно растворимая соль. Композиции могут подходить для введения любым подходящим способом, включая, например, интрадермальный, подкожный, чрескожный, внутримышечный, внутриаартериальный, внутрибрюшинный,
10 внутрисуставной, внутрикостный, интратекальный или другими подходящими путями введения. Предпочтительные композиции подходят для введения путем внутривенной инфузии.

Способы применения полипептидов

15 В настоящем изобретении предложено применение полипептидов согласно настоящему изобретению в различных способах. Например, полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть подходящими инструментами для биотехнологии. Полипептиды могут быть использованы для специфического расщепления *ex vivo* IgG, в частности IgG человека. В таком способе полипептид
20 можно инкубировать с образцом, содержащим IgG, в условиях, которые обеспечивают проявление активности специфической цистеин-протеазы. Специфическое расщепление может быть проверено, и продукты расщепления могут быть выделены с применением любого подходящего способа, такого как описанные в WO 2003051914 и WO 2009033670. Таким образом, способ можно применять, в частности, для получения
25 фрагментов Fc и F(ab')₂. Затем Fab-фрагменты могут быть получены путем проведения стадии восстановления (например, в 2-меркаптоэтаноламинe или цистеамине) F(ab')₂-фрагментов, которые образуются в результате расщепления IgG полипептидом согласно настоящему изобретению.

Этот способ также можно применять для обнаружения или анализа IgG в
30 образце или для удаления IgG из образца. Способ обнаружения IgG в образце обычно включает инкубацию полипептида с образцом в условиях, которые обеспечивают IgG-специфичное связывание и расщепление. Присутствие IgG может быть подтверждено определением специфических продуктов расщепления IgG, которые впоследствии могут быть проанализированы.

35 Полипептиды согласно настоящему изобретению также можно применять в терапии или профилактике. В терапевтических целях полипептиды или композиции вводят субъекту, уже страдающему расстройством или состоянием, в количестве,

достаточном для излечения, облегчения или частичного купирования состояния или одного или более его симптомов. Такое терапевтическое лечение может привести к уменьшению тяжести симптомов заболевания или к увеличению частоты или продолжительности бессимптомных периодов. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «терапевтически эффективное количество». В профилактических целях полипептиды или композиции вводят субъекту, у которого еще не проявляются симптомы расстройства или состояния, в количестве, достаточном для предотвращения или замедления развития симптомов. Такое количество определяют как «профилактически эффективное количество». Субъект может быть идентифицирован как подверженный риску развития заболевания или состояния любым подходящим способом. Таким образом, настоящее изобретение также относится к полипептиду согласно настоящему изобретению для применения в лечении человека или животного. Также в настоящем документе предложен способ предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта, который включает введение полипептида согласно настоящему изобретению субъекту в профилактически или терапевтически эффективном количестве. Полипептид можно вводить совместно с иммунодепрессантом. Полипептид предпочтительно вводят путем внутривенной инфузии, но его можно вводить любым подходящим путем, включая, например, интрадермальный, подкожный, чрескожный, внутримышечный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутрисуставной, внутрикостный, интратекальный или другими подходящими путями введения. Количество вводимого полипептида может составлять от 0,01 мг/кг МТ до 2 мг/кг МТ, от 0,05 до 1,5 мг/кг МТ, от 0,1 мг/кг МТ до 1 мг/кг МТ, предпочтительно от 0,15 мг/кг до 0,7 мг/кг МТ, и наиболее предпочтительно от 0,2 мг/кг до 0,3 мг/кг МТ, в частности, 0,25 мг/кг МТ. Полипептид можно вводить многократно одному и тому же субъекту при условии, что количество ADA в сыворотке субъекта, которое способно связываться с полипептидом, не превышает порогового значения, установленного врачом. Количество ADA в сыворотке субъекта, которое способно связываться с полипептидом, может быть определено любым подходящим способом, таким как специфичный для агента тест CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ титра.

Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть особенно подходящими для лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного патогенными антителами IgG. Соответственно, настоящее изобретение относится к полипептиду согласно настоящему изобретению для применения в лечении или предотвращении заболевания или состояния, опосредованного патогенными антителами IgG. В настоящем изобретении также предложен способ лечения или предотвращения заболевания или состояния,

опосредованного патогенными антителами IgG, включающий введение индивидууму полипептида согласно настоящему изобретению. Способ может включать повторное введение указанного полипептида. В настоящем изобретении также предложен полипептид согласно настоящему изобретению для применения в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного патогенными антителами IgG, в частности, аутоиммунного заболевания, которое полностью или частично опосредовано патогенными антителами IgG.

Патогенные антитела обычно могут быть специфичными в отношении антигена, который является мишенью при аутоиммунном заболевании или другом состоянии, полностью или частично опосредованном антителами. В таблице D приведен список таких заболеваний и связанных с ними антигенов. Полипептид согласно настоящему изобретению можно применять для лечения любого из этих заболеваний или состояний. Полипептид особенно эффективен для лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания, которое полностью или частично опосредовано патогенными антителами IgG.

Таблица D

ЗАБОЛЕВАНИЕ	АУТОАНТИГЕНЫ
АВО-несовместимая трансплантация	АВО-антигены эритроцитов
Болезнь Аддисона	Стероид 21-гидроксилаза, 17-альфа-гидроксилаза (17ОН) и фермент расщепления боковой цепи (P450 _{sc}), тиропероксидаза, тиреоглобулин и H+/K(+)-
Анти-ГБМ гломерулонефрит (связанный с болезнью Гудпасчера)	Антигломерулярная базальная мембрана (анти-ГБМ): неколлагеновые (NC1) домены коллагена альфа3альфа4альфа5(IV)
Васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA-ассоциированный васкулит) (гранулематоз Вегенера, синдром Чарга-Стросса, микроскопический полиангиит)	Миелопероксидаза, протеиназа 3
Анти-NMDAR энцефалит	Рецептор N-метил-D-аспартата (NMDAR)
Синдром антифосфолипидных антител (АФС) и катастрофический АФС	Отрицательно заряженные фосфолипиды в комплексе с белками плазмы, связывающими фосфолипиды (например, бета2GPI), кардиолипином, бета2-гликопротеином I и (бета2GPI)

Аутоиммунные буллезные заболевания кожи (пузырчатка). Листовидная пузырчатка (PF), fogo selvagem (FS) (эндемическая форма), вульгарная пузырчатка (PV)	IgG против кератиноцитов. Конкретной мишенью является десмоглеин (Dsg) 1 (десмосомальные кадгеринины)
Аутоиммунная гемолитическая анемия (АИНА)	Аутоантигены на красных кровяных тельцах
Аутоиммунный гепатит (АИГ)	Актин, антинуклеарные антитела (ANA), антитела к гладким мышцам (SMA), микросомальные антитела печени/почек (LKM-1), антитела к растворимому печеночному антигену (SLA/LP) и антимитохондриальные антитела (AMA), CYP2D6, CYP2C9-тиениловая кислота, UGT1A, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2E1, CYP11A1, CYP17 и CYP21
Аутоиммунная нейтропения (АИН)	FcgRIIb
Буллезный пемфигоид (BP)	Гемидесмосомальные белки BP230 и BP180 (коллаген XVII типа), ламинин 5, субъединица альфа6 интегрина альфабета4 и p200
Целиакия	трансглутаминаза 2 (TG2), трансглутаминаза 3, актин, ганглиозид, коллаген, кальретикулин и зонулин, компоненты щитовидной железы, эндокринной поджелудочной железы, антигастральные и печеночные, антиядерные компоненты, против ретикулина, актина, гладких мышц, кальретикулина, десмина, коллагенов, костей, против головного мозга, ганглиозида, нейронов, кровеносных сосудов
Хроническая крапивница	Альфа-субъединица высокоаффинного рецептора IgE, IgE
Полная врожденная блокада сердца (ССНВ)	Ro (антиген А синдрома Шегрена (SSA)), La (антиген В синдрома Шегрена (SSB))
Диабет типа 1А (Т1DM)	Аутоантитела к островковым клеткам (ICA), антитела к инсулину (IAA), декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAA или GAD), протеинтирозинфосфатаза (IA2 или ICA512), ассоциированный с инсулиновой пептид-2. Считается, что количество антител, а не индивидуальное антитело, является наиболее прогностическим фактором прогрессирования диабета.
Приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ)	145 кДа неколлагеновый аминотерминальный (NC-1) домен коллагена VII
Эссенциальная смешанная криоглобулинемия	Антигены эссенциальной смешанной криоглобулинемии

Синдром Гудпасчера (также известный как болезнь Гудпасчера и заболевание базальной мембраны клубочков)	альфа3 (IV) коллаген (= антиген Гудпасчера)
Болезнь Грейвса (Базедова болезнь), включает зоб и гипертиреоз, инфильтративный экзофтальм и инфильтративную дермопатию.	Рецептор тиреотропина (TSHR) Тиреопероксидаза (TPO)
Синдром Гийена-Барре (СГБ). Острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (ОВДП), острая моторная аксональная нейропатия (ОМАН)	Ганглиозиды GM1, GM1b, GD1a и GalNAc-GD1a, гликофинголипид, белки миелина PMP22 и P0
Гемофилия - приобретенный дефицит FVIII	Фактор VIII
IgA-нефрит	
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП)	Гликопротеин тромбоцитов (GP) IIb-IIIa и/или GPIb - IX
Миастенический синдром Ламберта-Итона (LEMS)	потенциалзависимые кальциевые каналы
Смешанное заболевание соединительной ткани (СЗСТ)	IgG, направленный против сплайсосомы, U1-snRNP
Множественная миелома	Антигены множественной миеломы
Миастения гравис Миастенический криз	Ацетилхолиновые рецепторы (AChR), мышечно-специфическая киназа (MuSK)
Миокардит, дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) (застойная кардиомиопатия)	сердечно-реактивные аутоантитела против нескольких антигенов, например, сердечный миозин
Оптикомиелит (НМО)	Аквапорин 4 (AQP4)
Первичный билиарный цирроз (ПБЦ)	пируватдегидрогеназный комплекс (PDC)-E2 и другие представители семейства щавелевокислотных дегидрогеназ, гликопротеин-210, p62, sp100
Первичный прогрессирующий рассеянный склероз (PPMS)	Миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (MOG), миелиновый протеолипидный белок (PLP), транскетолаза (TK), циклическая нуклеотидная

	фосфодиэстераза I типа (CNPase I), белок-медиатор ответа на коллапсин 2, тубулин бета4, нейрофасцин
Ревматическая болезнь сердца (РБС), (ревматическая лихорадка)	Сердечный миозин
Ревматоидный артрит (РА)	Коллаген типа II, цитруллин (-ированные белки (например, (фибриноген, виментин, филагрин, коллаген типа II, енолаза))), G6PI, RF (анти-Fc/IgG), виментин и цитокератин
Сывороточная болезнь, гиперчувствительность иммунных комплексов (III тип)	Различные антигены
Синдром Шегрена (SS)	Ro (антиген синдрома Шегрена A (SS-A)), La (антиген B(SS-B синдрома Шегрена)), р80 коилин, антинуклеарные антитела, антииреоидные, антицентромерные антитела (феномен Рейно), антикарбоангидраза II (дистальный почечно-канальцевый ацидоз), антимитохондриальные антитела (патология печени), криоглобулины (эволюция в неходжкинскую лимфому), альфа- и бета-фодрин, аутоантиген островковых клеток, поли(АДФ)рибозополимераза (PARP), NuMA, Golgins, NOR-90, M3-мускариновый рецептор
СКВ, включая волчаночный нефрит	Аутоантитела к компонентам ядра (например, двухцепочечной ДНК и нуклеосомам), двуцепочечной ДНК, PARP, Sm, PCDA, рPHK, белкам Р рибосомы, С1q
Синдром ригидного человека (SPS)	декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD), амфифизин
Системный склероз (склеродермия)	ДНК-топоизомераза I (Scl-70), U3 snRNP, U2 snRNP, 7-2 RNP, NOR-90, центромера-ассоциированные белки и ядрышковые антигены, Анти-Th/To, Anti-PHK полимераза I/III, анти-PDGF рецептор, анти-фибриллин-1, M3-мускариновый рецептор,
Отторжение трансплантата	Антигены отторжения трансплантата
Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП)	ADAMTS13
Гранулематоз Вегенера (гранулематоз полиангиитом)	
Антилекарственные	Любое лечение, эффективность которого

антитела (ADA)	снижается из-за наличия антител, специфичных к терапевтическому агенту. Включает, например, терапевтические средства на основе антител, векторы для генной терапии, клеточную терапию, включая иммунотерапию с адоптивным переносом клеток (ACT), например, с использованием CAR-T-клеток
----------------	---

В другом варианте осуществления полипептид согласно настоящему изобретению может быть использован в способе для увеличения благоприятного эффекта терапии или терапевтического средства у субъекта. Способ включает две 5 стадии, которые упоминаются в настоящем документе как стадии (a) и (b).

Стадия (a) включает введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению. Количество вводимого полипептида предпочтительно достаточно для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта. Стадия (b) включает последующее введение субъекту указанной терапии или 10 терапевтического агента. Стадии (a) и (b) разделены интервалом времени, который предпочтительно является достаточным для того, чтобы произошло расщепление практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта. Указанный интервал обычно может составлять не менее 30 минут и не более 21 дня.

Терапевтический агент, благоприятный эффект которого улучшают, обычно 15 представляет собой антитело, которое вводят для лечения рака или другого заболевания. Терапевтический агент может представлять собой IVIg. В контексте этого варианта осуществления настоящее изобретение может быть альтернативно описано как способ лечения рака или другого заболевания у субъекта, включающий (a) введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению; и (b) 20 последующее введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела для лечения указанного рака или указанного другого заболевания; при этом:

- количество вводимого полипептида достаточно для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта; и
- стадии (a) и (b) разделены временным интервалом не менее 30 минут и не 25 более 21 дня.

Другими словами, в настоящем изобретении также предложен полипептид для применения в таком способе лечения рака или другого заболевания. В настоящем изобретении также предложено применение агента в производстве лекарственного средства для лечения рака или другого заболевания таким способом. Рак может 30 представлять собой острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, рак, связанный со СПИДом, лимфому, связанную со СПИДом, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, детскую мозжечковую

или церебральную, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, внепеченочный рак, рак мочевого пузыря, рак кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, опухоль головного мозга, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, опухоль головного мозга, 5 эпендимому, опухоль головного мозга, медуллобластому, опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциноиды, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую 15 мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга из семейства опухолей Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль у детей, внегонадную герминогенную опухоль, рак внепеченочного желчного протока, рак глаза, внутриглазную меланому, рак глаза, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка (Stomach), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоль зародышевых 20 клеток: экстракраниальную, экстрагонадную или яичниковую, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, церебральную астроцитому у детей, глиому зрительного пути и гипоталамуса у детей, карциноид желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути, интраокулярную меланому, карциному островковых клеток (эндокринная поджелудочная железа), саркому Капоши, рак почки (почечно-клеточный рак), рак гортани, лейкозы, лейкоз, острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, острый миелоидный (также называемый острым миелогенным лейкозом), лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый хроническим лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, хронический миелогенный (также называемый хроническим миелоидным лейкозом), лейкоз, волосатоклеточный, рак губы и полости рта, липосаркому, рак печени (первичный), рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный, лимфомы, лимфому, связанную со СПИДом, лимфому, Беркитта, лимфому, кожную Т-клеточную, лимфому, Ходжкина, лимфомы, неходжкинские (старая классификация всех лимфом, кроме лимфомы Ходжкина), лимфому, первичную центральной нервной системы,

макроглобулинемию, Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланому, меланому, внутриглазную (глаза), карциному клеток Меркеля, мезотелиому, злокачественные новообразования у взрослых, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи неизвестного

5 первичного происхождения, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/неоплазию плазматических клеток, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, хронический, миелоидный лейкоз, острый у взрослых, миелоидный лейкоз, острый

10 детский, миелому, множественную (рак костного мозга), миелопролиферативные заболевания, рак полости носа и околоносовых пазух, назофарингеальную карциному, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников (поверхностную эпителиально-

15 стромальную опухоль), опухоль зародышевых клеток яичников, опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, островковых клеток, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидных желез, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, астроцитому шишковидного тела, герминому шишковидного тела, пинеобластому и

20 супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточную неоплазию/множественную миелому, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак (рак почки), почечной лоханки и мочеточника, переходно-клеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак

25 слюнных желез, саркому, опухоли семейства Юинга, саркому Капоши, саркому, мягких тканей, саркому, матки, синдром Сезари, рак кожи (не являющийся меланомой), рак кожи (меланому), карциному кожи, клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи неясного первичного происхождения, метастатический, рак желудка, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, Т-клеточную

30 лимфому, кожи – см. грибовидный микоз и синдром Сезари, рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическую опухоль, мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный

35 рак, рак уретры, рак матки, эндометрия, саркому матки, рак влагалища, глиому зрительного пути и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса (рак почки).

Рак предпочтительно представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких, рак шейки матки, рак эндометрия, рак почек (почечно-клеточный рак), рак пищевода, рак щитовидной железы, рак кожи, лимфомы, меланомы или лейкозы.

Антитело, вводимое на стадии (b), предпочтительно является специфичным в отношении опухолевого антигена, связанного с одним или более из вышеуказанных типов рака. Представляющие интерес мишени для антитела для применения в способе, включают CD2, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD32, CD33, CD40, CD52, CD54, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD80, CD86, CD105, CD138, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, GPNMB, PSMA, Cripto, ED-B, TMEFF2, EphA2, EphB2, FAP, α v интегрин, мезотелин, EGFR, TAG-72, GD2, CA1X, 5T4, α 4 β 7 интегрин, Her2. Другими мишенями являются цитокины, такие как интерлейкины с IL-1 по IL-13, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор роста опухоли бета (TGF- β), колониестимулирующий фактор (CSF) и гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). См. Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Aggrawal *et al.* eds., Blackwell Scientific, Boston, MA 1991). Другими мишенями являются гормоны, ферменты и внутриклеточные и межклеточные мессенджеры, такие как аденилатциклаза, гуанилциклаза и фосфолипаза C. Другими представляющими интерес мишенями являются лейкоцитарные антигены, такие как CD20 и CD33. Лекарственные средства также могут представлять интерес. Молекулы-мишени могут быть человеческими, молекулами млекопитающих или бактерий. Другими мишенями являются антигены, такие как белки, гликопротеины и углеводы микробных патогенов, как вирусных, так и бактериальных, и опухолей. Другие мишени описаны в патенте США 4366241.

Антитело может быть присоединено напрямую или опосредованно к цитотоксичному фрагменту или к детектируемой метке. Антитело можно вводить одним или более путями введения с использованием одного или более из множества способов, известных в данной области техники. Путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения антител включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение», используемая в настоящем документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции. В качестве альтернативы, антитело можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения. Также предпочтительным является

местное введение, в том числе перитуморальное, околоопухолевое, внутриопухолевое, внутриочаговое, околоочаговое, внутриполостное введение, интравезикальное введение и путем ингаляции.

5 Подходящая доза антитела согласно настоящему изобретению может быть определена квалифицированным практикующим врачом. Фактические уровни дозировки антитела можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являющееся токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества 10 фармакокинетических факторов, включая активность конкретного используемого антитела, способ введения, время введения, скорость выведения антитела, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и /или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и 15 предшествующую историю болезни пациента, проходящего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Подходящая доза антитела может находиться, например, в диапазоне примерно от 0,1 мкг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела пациента, подлежащего лечению. Например, подходящая дозировка может составлять от примерно 1 мкг/кг до 20 примерно 10 мг/кг массы тела в сутки или от примерно 10 мкг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела в сутки.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (*например*, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, или стадия (b) способа может включать несколько 25 разделенных доз, вводимых в течение времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от критичности терапевтической ситуации, при условии, что необходимый интервал между стадиями (a) и (b) не превышен. В частности, может быть выгодным получение композиций для перорального введения в единичной дозированной форме для удобства введения и 30 однородности дозировки. В настоящей заявке единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для подлежащего лечению субъекта; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект в сочетании с 35 необходимым фармацевтическим носителем.

Антитело стадии (b) можно вводить в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией. Способ может дополнительно включать введение дополнительного

противоракового антитела или другого терапевтического агента, которое можно вводить вместе с антителом стадии (b) в одной композиции или в отдельных композициях как часть комбинированной терапии. Например, антитело стадии (b) можно вводить до, после или одновременно с другим агентом.

- 5 Антитело может представлять собой абаговомаб, абциксимаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, азелизумаб, атинумаб, атлизумаб (= тоцилизумаб), аторолимумаб, бапинейзумаб, базиликсимаб, 10 бавитуксимаб, бектумомаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, биватузумаб мертансин, блинатумомаб, блосозумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксомаб, CC49, цеделизумаб, цертолизумаб пегол, 15 цетуксимаб, Ch.14.18, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетракетан, конатумумаб, концизумаб, кренезумаб, CR6261, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, даратумумаб, демцизумаб, деносумаб, детумомаб, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, дузигитумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, 20 эфунгумаб, элотузумаб эселимомаб, энаватузумаб, энлимомаб пегол, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, фонтолизумаб, форалумаб, 25 форавирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, GS6624, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, иговомаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтансин, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб 30 озогамидин, ипилимумаб, иратумумаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лампализумаб, лебрикизумаб, лемалесомаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лигелизумаб, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, лорвотузумаб мертансин, лукатумумаб, люмиликсимаб, мапатумумаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, 35 митумомаб, могомулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, нерелимомаб, несвакумаб,

нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, 5 панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO140, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, 10 рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, 15 такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, TGN1412, тицилимумаб (= тремелимумаб), тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб (= атлизумаб), торализумаб, тозитумомаб, тралокинумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тукотузумаб 20 целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вапаликсимаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб или золимумаб аритокс.

Предпочтительные антитела включают натализумаб, ведолизумаб, белимумаб, 25 атацицепт, алефацепт, отеликсизумаб, теплизумаб, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, эпратузумаб, алемтузумаб, абатацепт, экулизумаб, омализумаб, канакинумаб, меплизумаб, реслизумаб, тоцилизумаб, устекинумаб, бриакинумаб, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, голимумаб, трастузумаб, гемтузумаб, озогамидин, ибритумомаб, тиуксетан, тозитумомаб, цетуксимаб, 30 бевацизумаб, панитумумаб, деносуамаб, ипилимумаб, брентуксимаб и ведотин.

Терапия, благоприятный эффект от которой увеличивают, обычно представляет собой трансплантацию органов. Орган может быть выбран из почек, печени, сердца, поджелудочной железы, легких или тонкой кишки. Субъект, подлежащий лечению, предпочтительно может быть сенсibilизированным или 35 высокосенсibilизированным. Под «сенсibilизированным» подразумевается, что у субъекта выработались антитела к антигенам главной гистосовместимости человека (MHC) (также называемым антигенами лейкоцитов человека (HLA)). Антитела к HLA

происходят из аллогенно сенсibilизированных В-клеток и обычно присутствуют у пациентов, которые ранее были сенсibilизированы переливанием крови, предшествующей трансплантацией или беременностью (Jordan *et al.*, 2003).

5 Сенсibilизирован ли потенциальный реципиент трансплантата или нет, можно определить любым подходящим способом. Например, тест панели реактивных антител (PRA) можно использовать для определения сенсibilизации реципиента. Показатель PRA >30% обычно означает, что пациент имеет «высокий иммунологический риск» или «сенсibilизирован». В качестве альтернативы может быть проведен перекрестный тест, при котором образец крови потенциального донора трансплантата смешивается с кровью предполагаемого реципиента. Положительная перекрестная совместимость означает, что у реципиента присутствуют антитела, которые реагируют на образец донора, что указывает на то, что реципиент сенсibilизирован и трансплантацию проводить не следует. Тесты на перекрестную совместимость обычно проводят в качестве окончательной проверки непосредственно перед трансплантацией.

Наличие высокого титра антител против антигенов МНС потенциального донора (то есть донор-специфических антител (ДСА)) является прямым противопоказанием к трансплантации вследствие риска острого антителоопосредованного отторжения. Вкратце, сенсibilизация к антигенам МНС донора затрудняет идентификацию подходящего донора. Положительный тест на перекрестную совместимость является однозначным препятствием для трансплантации. Поскольку примерно треть пациентов, ожидающих трансплантации почки, сенсibilизированы, а до 15% имеют высокую сенсibilизацию, это приводит к накоплению пациентов, ожидающих трансплантации. В США среднее время нахождения в листе ожидания на трансплантацию почки в 2001–2002 гг. составляло 1329 дней для лиц с показателем панели реактивных антител (PRA) 0–9%, 1920 дней для лиц с PRA 10–79% и 3649 дней для тех, у кого PRA 80% или выше (база данных OPTN, 2011).

30 Одной из общепринятых стратегий преодоления барьера ДСА является применение плазмафереза или иммунной адсорбции, часто в комбинации, например, с внутривенным гамма-глобулином (IVIg) или ритуксимабом для снижения уровня ДСА до уровня, при котором можно рассматривать трансплантацию (Jordan *et al.*, 2004; Montgomery *et al.*, 2000; Vo *et al.*, 2008a; Vo *et al.*, 2008b). Тем не менее, плазмаферез, иммунная адсорбция и лечение внутривенным иммуноглобулином имеют недостаток, заключающийся в том, что они неэффективны и требуют тщательного планирования, поскольку они включают повторные курсы лечения в течение длительного периода времени. Когда становится доступным орган от умершего донора, его необходимо

трансплантировать в течение нескольких часов, поскольку длительное время холодной ишемии является одним из наиболее важных факторов риска задержки функции трансплантата и потери аллотрансплантата при трансплантации почки (Ojo et al., (1997) Transplantation 63:968-74).

5 Напротив, способ согласно настоящему изобретению обеспечивает быстрое, временное и безопасное удаление ДСА у потенциального реципиента трансплантата. Введение полипептида согласно настоящему изобретению непосредственно перед трансплантацией способно эффективно десенсибилизировать
10 высокосенсибилизированного пациента, что делает возможной трансплантацию и позволяет избежать острого отторжения, опосредованного антителами. Однократная доза полипептида перед трансплантацией позволит провести трансплантацию тысячам пациентов с донор-специфическими антителами IgG.

 В контексте этого варианта осуществления способ может быть альтернативно описан как способ лечения органной недостаточности у субъекта, включающий (a)
15 введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению и (b) последующую трансплантацию замещающего органа субъекту; причем:

- количество вводимого полипептида достаточно для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта; и
- стадии (a) и (b) разделены временным интервалом не менее 30 минут и не
20 более 21 дня.

 Другими словами, этот вариант осуществления может быть описан как способ предотвращения отторжения трансплантированного органа у субъекта, особенно острого отторжения трансплантата, опосредованного антителами, причем способ включает, не менее чем за 30 минут и не более 21 дня до трансплантации органа,
25 введение субъекту полипептида согласно настоящему изобретению, при этом количество вводимого указанного полипептида достаточно для расщепления практически всех молекул IgG, присутствующих в плазме субъекта. В настоящем изобретении также предложено применение полипептида согласно настоящему изобретению в таком способе лечения органной недостаточности или
30 предотвращения отторжения трансплантата, особенно острого отторжения трансплантата, опосредованного антителами. В настоящем изобретении также предложено применение полипептида согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения органной недостаточности или для предотвращения отторжения трансплантата таким способом. В этом варианте
35 осуществления способ согласно настоящему изобретению может дополнительно включать стадию, проводимую во время или непосредственно перед трансплантацией, которая включает подавление индукции Т-клеток и/или В-клеток у

пациента. Упомянутое подавление индукции обычно может включать введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует Т-клетки, и/или введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует В-клетки. Агенты, которые убивают или ингибируют Т-клетки, включают муромонаб, базиликсимаб, даклизумаб, антитело против тимоцитарного глобулина (ATG) и лимфоцитарный иммуноглобулин, препарат против тимоцитарного глобулина (ATGAM). Известно, что ритуксимаб убивает или ингибирует В-клетки.

Полипептиды, обладающие активностью цистеин-протеазы IgG, такие как полипептиды согласно настоящему изобретению, также могут быть подходящими в способах индукции гемопозитического химеризма у субъекта, например, в контексте трансплантации гемопозитических стволовых клеток/клеток-предшественников (HSPC) субъекту. Таким образом, полипептид согласно настоящему изобретению можно применять в способе индукции гемопозитического химеризма у субъекта, включающем проведение режима кондиционирования согласно настоящему изобретению и последующее введение субъекту HSPC в количестве, достаточном, и в условиях, подходящих для вызова гемопозитического химеризма у субъекта. В качестве альтернативы способ может быть описан как способ стабильной трансплантации HSPC. HSPC могут быть аутологичными (используются собственные клетки субъекта/пациента) или сингенными (клетки получены от генетически идентичного близнеца), или они могут быть аллогенными (клетки получены от отдельного, неидентичного донора). Иммунные осложнения, снижающие вероятность успешного приживления HSPC у реципиента, наиболее значимы для аллогенных клеток, и поэтому способ индукции гемопозитического химеризма наиболее эффективен для таких клеток. Однако иммунные осложнения могут возникнуть даже с аутологичными клетками, если происходит экспрессия продукта, воздействию которого реципиент ранее не подвергался. Если аутологичная клетка была генетически модифицирована для экспрессии генной терапии, клетка может быть достаточно изменена, чтобы спровоцировать иммунный ответ. Например, может иметь место иммунный ответ на экспрессированный продукт генной терапии. То же самое применимо, если HSPC был генетически модифицирован для экспрессии другого типа HLA, который не соответствует HLA реципиента.

Полипептиды, обладающие активностью цистеин-протеазы IgG, такие как полипептиды согласно настоящему изобретению, также можно использовать в комбинации с иммунотерапией с адоптивным переносом клеток. Эффективность иммунотерапии с адоптивным переносом клеток может быть снижена из-за ограниченной выживаемости и ограниченной устойчивой активности перенесенных клеток, таких как CAR-T-клетки. Белки с цистеин-протеазой IgG могут защищать

перенесенные клетки. В частности, ранее существовавшие антитела и антитела, образующиеся после введения дозы перенесенных клеток, могут сократить потенциал перенесенных клеток, а терапевтический эффект перенесенных клеток будет усиливаться за счет удаления эффекторных функций антител посредством кондиционирования реципиента. Таким образом, введение белков с активностью цистеин-протеазы IgG может повысить выживаемость и активность перенесенных клеток, что, следовательно, улучшит благоприятный эффект у пациента от адоптивной иммунотерапии с переносом клеток и обеспечит улучшение терапии и прогноза в контексте, например, лечения рака. В этом контексте способ лечения рака может включать введение полипептида согласно настоящему изобретению, обладающего активностью цистеин-протеазы IgG, до и/или после введения одной или более доз иммунотерапии с адоптивным переносом клеток. Полипептиды, обладающие активностью цистеин-протеазы IgG, такие как полипептиды согласно настоящему изобретению, также можно использовать в комбинации с адоптивной иммунотерапией с переносом клеток в контексте способов лечения аутоиммунных состояний, инфекций и состояний, опосредованных вредными антителами. Такие способы позволяют инактивировать как ранее существовавшие антилекарственные антитела (ADA), так и антитела, вырабатываемые иммунотерапией с адоптивным переносом клеток.

20 Примеры

Если не указано иное, используемые способы являются стандартными способами биохимии и молекулярной биологии. Примеры подходящих учебников по методологии включают Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley and Sons, Inc.

Пример 1 - Экспрессия и очистка pCART239

Зрелую молекулу и последовательность IdeZ анализировали, и идентифицировали области, подходящие для мутации. В некоторых случаях для оценки вероятного исхода мутации использовали оценку *in silico*. Приняв решение о последовательности pCART239, кДНК, кодирующую каждый полипептид, создавали в GeneCust, Люксембург, либо путем сайт-направленной мутации исходной последовательности, либо путем синтеза, в зависимости от количества введенных мутаций. кДНК секвенировали и переносили в вектор экспрессии pET9a (Novagen) в рамке считывания с С-концевой меткой 6x His, соединенной с С-концом коротким глициновым линкером (3x Gly). Для бактериальной экспрессии добавляли N-концевой метионин. Таким образом, полипептид pCART239 является эквивалентным SEQ ID

NO: 1 с дополнительным (1) N-концевым метионином и (2) C-концевой 6x His-меткой, соединенной с C-концом коротким глициновым линкером (3x Gly).

Экспрессионную плазмиду pCART239 трансформировали в *E. coli* T7E2 (SOURCE) и высевали на чашки с агарозой LB, содержащие 50 мкг/мл канамицина.

5 Собирали отдельные колонии, и начинали культивирование в течение ночи (10 мл LB-среды) при 37°C, 250 об/мин. На следующий день в 2 флакона, содержащие 125 мл LB-среды + 50 мкг/мл канамицина + 1:100000 разбавленный противовспениватель, инокулировали 5 мл ночной культуры. Колба для культивирования во время инокуляции уже находилась при 37°C, и культуры выращивали до OD 0,6-0,7 (37°C,

10 300 об/мин). В этот момент добавляли IPTG (конечная концентрация 1 мМ) для индукции экспрессии, и культуры инкубировали дополнительно в течение по меньшей мере 2 часов. После инкубации бактериальные суспензии собирали центрифугированием (10 мин, 4000×g, 4°C) и отбрасывали супернатанты. Осадки один раз промывали в PBS (30 мл), повторно центрифугировали для удаления

15 супернатанта, а конечные осадки замораживали при -20°C и хранили в морозильной камере в течение ночи. Для лизиса бактерий использовали либо гомогенизатор Panda Plus 2000 (GEA) в соответствии с инструкциями производителя, либо протокол замораживания-оттаивания (три цикла замораживания/оттаивания в 10 мл PBS и с помощью стерильных стеклянных шариков). После циклов замораживания/оттаивания

20 пробирки центрифугировали (20 мин, 25 000 g, 4°C) для выделения бактериального лизата (супернатанта), который затем хранили на льду. Конечные бактериальные лизаты объединяли и стерильно фильтровали через нейлоновый фильтр 0,2 мкм (HPF Millex®-Nylon), а белок очищали с использованием предварительно заполненных спин-колонок Ni-NTA (ThermoFisher). После очистки к элюату добавляли DTT (конечная

25 концентрация 5 мМ) и ЭДТА (конечная концентрация 5 мМ) перед заменой буфера (Amicon Ultra-4 10K). Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Чистоту и стабильность очищенных белков в процессе очистки экспрессии оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) с использованием

30 не требующего окрашивания 12% предварительно залитого геля Mini-PROTEAN®TGX™ (Biorad) (Фигура 1). На Фигуре 1А показано, что индукция IPTG и последующая сверхэкспрессия pCART239 были успешными. На Фигуре 1В показано, что процесс очистки также прошел успешно и привел к получению образца pCART239 высокой чистоты и стабильности.

35

Пример 2 - Эффективность pCART207, pCART229, N240, pCART242 против Humira (IgG1) и XGEVA (IgG2)

В этом примере человеческий IgG1 представлен Humira (Abbvie) и IgG2 XGEVA (Amgen). Они используются для сравнения активности вариантов IdeZ, а также положительного контроля IdeS при расщеплении моноклонального IgG человека.

5 Ферменты варианта IdeZ (и IdeS) титровали в 0,05% BSA в PBS в стадиях разведения 1:3 от начальной концентрации 3,3 мкг/мл, а продукты расщепления анализировали с помощью SDS-PAGE (градиентный гель 4-20%). Таким образом, тестируемый полипептид pCART242 является эквивалентным SEQ ID NO: 2 с дополнительным (1) N-концевым метионином и (2) C-концевой 6х His-меткой, соединенной с C-концом коротким глициновым линкером (3х Gly).

10

Способы:

1. 25 мкл фермента и контрольного (буферного) разведения переносили на мультититровальный планшет.
- 15 2. Реакцию начинали добавлением в каждую лунку по 25 мкл раствора Humira или XGEVA с концентрацией 2 мг/мл. Это приводило к 1 мг/мл каждого антитела в реакции. Принимая во внимание серийные разведения, максимальная тестируемая концентрация IdeZ (или IdeS) составляла от 3,3 мкг/мл до минимума 0,057 нг/мл.
- 20 3. Планшеты инкубировали при 37°C при медленном вращении в течение 2 часов.
4. После инкубации 10 мкл каждого образца смешивали с 30 мкл двукратного загрузочного буфера SDS в титрационных микропланшетах. После хранения в течение ночи (4-8°C) его переносили в пробирки на 1,5 мл и инкубировали при 92°C в течение 5 минут, после чего 10 мкл образца загружали в 15-луночный предварительно залитый гель 4-20% Mini-PROTEAN®TGX™, и образцы анализировали в SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях.

30

Гели, демонстрирующие расщепление IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA) вариантами IdeZ, показаны на Фигурах 2 и 3 соответственно. Различные панели представляют разные наборы экспериментов (но протокол в каждом случае был идентичным).

35 Приблизительные концентрации для расщепления 1-й и 2-й тяжелых цепей IgG1/IgG2 оценивали по картине расщепления, показанной в гелях, следующим образом:

Таблица 1A: Приблизительные концентрации для расщепления 1-й и 2-й тяжелых цепей IgG1 (Фигура 2A).

ID	1 ^я IgG1 тяжелая цепь IgG до sIgG Конц. фермента (нг/мл)	2 ^я IgG1 тяжелая цепь sIgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Приблизительн знач-е EC50, т.е. равные количества sIgG и F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
IdeS	4,5	400	120
pCART229	4,5	400	40 - 120
pCART239	4,5	120	10 - 40

5 Таблица 1B: Приблизительные концентрации для расщепления 1-й и 2-й тяжелых цепей IgG1 (Фигура 2B).

ID	1 ^я IgG1 тяжелая цепь IgG до sIgG Конц. фермента (нг/мл)	2 ^я IgG1 тяжелая цепь sIgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Приблизительн. знач-е EC50, т.е. равные количества sIgG и F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
IdeS	1,5	120	40 - 120
pCART207	1,5	120	40
pCART229	1,5	120	40
pCART242	1,5	40	10 - 40

Таблица 2A: Приблизительные концентрации для расщепления 1-й и 2-й тяжелых цепей IgG2 (Фигура 3A).

ID	1 ^я IgG2 тяжелая цепь IgG до sIgG Конц. фермента (нг/мл)	2 ^я IgG2 тяжелая цепь sIgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Приблизительн знач-е EC50, т.е. равные количества sIgG и F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
IdeS	40	1100	120 - 400
pCART229	120	3300	1100 - 3300
pCART239	10	1100	120 - 400

10 Таблица 2B: Приблизительные концентрации для расщепления 1-й и 2-й тяжелых цепей IgG2 (Фигура 3B).

ID	1 ^я IgG2 тяжелая цепь IgG до sIgG Конц. фермента (нг/мл)	2 ^я IgG2 тяжелая цепь sIgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Приблизительн знач-е EC50, т.е. равные количества sIgG и F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
IdeS	10	400	120 - 400

pCART207	40	3300	1100
pCART229	40	3300	1100
pCART242	10	400	120 - 400

Краткий итог:

Эффективность IdeS, pCART207, pCART229 очень близка в отношении расщепления IgG1 (Humira). Для pCART239 и N240 наблюдается более высокая эффективность по сравнению как с IdeS, так и с очень похожим вариантом pCART229. N240 и pCART242, по-видимому, более активны, чем IdeS, в расщеплении второй тяжелой цепи IgG1. N240 и pCART242 обладают более высокой активностью, чем pCART229 и pCART207, главным образом в отношении 2-го расщепления IgG2 (Xgeva), но также более активны в отношении расщепления 1-й тяжелой цепи IgG2.

Пример 3 - Эффективность N240 против подклассов IgG человека

В этом отчете описана характеристика активности N240 *in vitro* путем расщепления различных подклассов IgG. В случае подклассов IgG сравнивают две разные партии N240 собственного производства, и в качестве эталонного материала используют IdeS.

Способы:

1. 25 мкл фермента N240 или IdeS и контрольного (буферного) разведения переносили на мультититровальный планшет. Фермент серийно разбавляли 1:3 в 0,05% BSA в PBS между каждой последующей лункой.
2. Реакцию начинали добавлением в каждую лунку по 25 мкл 2 мг/мл раствора человеческого IgG. Это приводило к 1 мг/мл каждого антитела в реакции. Используемый IgG1 представлял собой Humira (Abbvie), используемый IgG2 представлял собой XGEVA (Amgen), используемый IgG3 был получен от Sigma (I5654 Lot#SLBW0899), используемый IgG4 был получен от Abcam (ab90286 Lot#GR3180469).
3. Планшеты инкубировали при 37°C при медленном вращении в течение 2 часов.
4. После инкубации 10 мкл каждого образца смешивали с 30 мкл двукратного загрузочного буфера SDS в титрационных микропланшетах. После хранения в течение ночи (4-8°C) его переносили в пробирки на 1,5 мл и инкубировали при 92°C в течение 5 минут, после чего 10 мкл образца

загружали в 15-луночный предварительно залитый гель 4-20% Mini-PROTEAN®TGX™.

5 Гели, демонстрирующие расщепление подклассов IgG с помощью N240 и IdeS, показаны на Фигуре 4.

Оценочные значения EC_{50} , полученные при визуальном осмотре гелей, перечислены в Таблице 3 ниже.

Таблица 3: Результаты EC_{50} для расщепления IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4

	IgG1 EC_{50} sclgG	IgG1 EC_{50} F(ab')₂		IgG2 EC_{50} sclgG	IgG2 EC_{50} F(ab')₂
N240	0,5 нг/мл	14 нг/мл		4,6 нг/мл	120 нг/мл
IdeS	1 нг/мл	80 нг/мл		3 нг/мл	120 нг/мл

10

	IgG3 EC_{50} sclgG	IgG3 EC_{50} F(ab')₂		IgG4 EC_{50} sclgG	IgG4 EC_{50} F(ab')₂
N240	7 нг/мл	15 нг/мл		2 нг/мл	62 нг/мл
IdeS	2,2 нг/мл	15 нг/мл		2 нг/мл	180 нг/мл

Краткий итог:

1. Все четыре подкласса человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 расщепляются N240.
2. Более высокая активность (по отношению к IdeS) отчетливо видна для N240, особенно для расщепления второй цепи. EC_{50} F(ab')₂ для IgG1 была примерно в 5 раз выше для IdeS по сравнению с N240.
3. В случае IgG2, IgG3 и IgG4 N240 имел аналогичную или немного более низкую активность, чем IdeS.

20

Пример 4 - Сравнение анализа активности MSD между N240 и IdeS

Способы:

- 25 Более подробное изложение принципов, лежащих в основе анализа активности MSD, обсуждается ниже в Примере 5.

Вкратце, козий античеловеческий IgG, специфичный к фрагменту F(ab')₂, наносили на 96-луночный планшет MSD. После блокировки планшет промывали, и в планшет добавляли эталонный материал N240 и тестируемый образец IdeS, разведенные в серии концентраций. Добавляли фиксированную концентрацию человеческого IgG, и планшет инкубировали при 37°C. После инкубации и промывки в планшет добавляли смесь для обнаружения, содержащую биотинилированный мышиный античеловеческий IgG (Fc-специфический) и стрептавидин, меченный SULFO-TAG. После окончательной инкубации и промывки добавляли буфер для считывания. Используя прибор MSD, измеряли интенсивность света, испускаемого SULFO-TAG, для обеспечения количественного измерения нерасщепленного и однократно расщепленного IgG в образцах. Эталонный материал N240 и тестируемые образцы IdeS анализировали в двух повторах лунок и в трех повторах планшетов. EC₅₀ для каждого эталонного и тестируемого образцов получали путем подгонки результатов к 5-параметрической кривой. Относительную активность (%) для каждого тестируемого образца определяли путем деления EC₅₀Ref/EC₅₀Test и умножения на 100%. Сообщаемое значение является средним значением для трех разных планшетов.

Полученные кривые разведения, представляющие расщепление IgG для IdeS и N240, показаны на Фигуре 5.

Рассчитанная средняя относительная активность для N240 составляла примерно 300% по сравнению с IdeS.

ПРИМЕР 5 - Эффективность pCART239 против IgG в сыворотке человека

Вариант IdeZ pCART239 был дополнительно охарактеризован путем измерения его активности в сыворотке.

В качестве субстрата IgG использовали пул сывороток человека от 100 человек.

SDS-PAGE

Серии разведений, используемые для pCART239, представляли собой следующие: 30, 15, 7,5, 3,75, 1,9, 0,9, 0,2, 0,2, 0,1, 0,06 и 0,03 мкг/мл, а также анализ активности и протокол анализа SDS-PAGE, как указано в примерах 2 и 3 следуют далее.

Гели, демонстрирующие расщепление IgG сыворотки с помощью pCART239, показаны на Фигуре 6. Фигуры показывают, что pCART239 обладает активностью расщепления IgG в пуле сыворотки, и на геле оценивают расщепление IgG до sIgG примерно при 0,9 мкг/мл фермента (Фигура 6, верхняя панель). Затем sIgG расщепляют на фрагменты F(ab')₂ и Fc при концентрации фермента приблизительно 1,9 мкг/мл.

Значения активности, полученные в сыворотке, ниже, чем значения, полученные в буфере, что является известным явлением из предыдущих исследований из-за присутствия в сыворотке ингибирующих антилекарственных антител (ADA). Чтобы убедиться, что в сыворотке нет другого специфического ингибирующего фактора, кроме ингибирующих ADA, был проведен эксперимент с добавлением неактивного варианта pCART239 (pCART243) в концентрации 0,1 мг/мл. Добавление осуществляли в высоком молярном избытке, и оно должно связывать инактивирующие ADA до такой степени, что активность pCART239 в сыворотке восстанавливается. Было показано, что это так (Фигура 6, нижняя панель), и присутствие pCART243 позволяло расщеплять IgG при гораздо более низкой концентрации pCART239. Интактный IgG начинал расщепляться уже при 0,03 мкг/мл, а все IgG превращались в sIgG при 0,5 мкг/мл.

Платформа электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery (MSD)

Для дальнейшего исследования активности N240 в сыворотке был проведен анализ активности MSD в матрице сыворотки.

Принцип анализа заключался в том, чтобы покрыть лунки мультититрационного планшета F(ab)₂-фрагментом, направленным на антитела IgG человека со специфичностью к области Fab. Затем оттитрованные концентрации полипептида цистеин-протеазы IgG (испытуемый или контрольный) инкубировали вместе с сывороткой человека в лунках. Количество интактного или одного расщепленного IgG человека, связанного с лунками, измеряли с использованием детекторного антитела, направленного на IgG человека со специфичностью в отношении Fc-части антитела. Чем выше концентрация данного полипептида цистеин-протеазы IgG в лунке, тем меньше интактных антител IgG человека будет связано с лункой, давая более низкий сигнал. Точно так же более активный полипептид цистеиновой протеазы IgG будет давать меньший сигнал, чем менее активный полипептид цистеин-протеазы IgG, если он присутствует в той же концентрации. Для контроля IdeS (pCART124) и N240 были подготовлены кривые титрования доза-ответ. Активность оценивали путем расчета значений EC₅₀ для тестируемой цистеин-протеазы. Более низкое значение EC₅₀

представляет более активную цистеин-протеазу IgG. Расщепление первой тяжелой цепи IgG, IgG до sclgG, в этом анализе не видно, так как Fc-часть IgG все еще присутствует и может быть обнаружена Fc-специфичным детекторным антителом.

5 Краткое изложение лабораторного протокола: Лунки мультититрационных планшетов покрывали в течение ночи (+2–8°C) F(ab)₂-фрагментом, специфичным к козьим античеловеческим Fab-специфичным антителам (0,5 мкг/мл) (Jackson #109-006-097), затем промывали PBS+0,05% Tween 20 (PBS-T) и блокировали в 0,45% рыбьего желатина в PBS-T (блокирующий буфер) на 45-120 мин при комнатной температуре. Контрольные IdeS (pCART124) и тестируемые полипептиды цистеин-
10 протеазы IgG готовили в виде серий титрования с шагом 1:4 в блокирующем буфере с начальной концентрацией 80 мкг/мл. В лунки добавляли равные объемы (25 мкл) сыворотки человека и оттитрованные количества полипептидов цистеин-протеазы IgG и инкубировали 2 часа при встряхивании в контролируемой температуре окружающей среды при 37°C, а затем промывали PBS-T. Биотинилированное мышинное Fc-
15 специфичное антитело против человеческого IgG (m-a-hIgG Bio II, партия: C0013-ZC43C, Southern Biotech) (600 нг/мл) смешивали со Strep-sulfo (200 нг/мл) и добавляли в мультититровальные планшеты. Планшеты запечатывали алюминиевой лентой и инкубировали при +25°C в течение 1 часа при встряхивании. Затем планшеты промывали в PBS-T и в каждую лунку добавляли 150 мкл двукратно разбавленного
20 буфера для считывания Т (буфер для считывания MSD Т, кат. № R92TC-2). Планшеты немедленно считывали с помощью планшет-ридера MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, модель 1300.

Полученные стандартные кривые, представляющие расщепление IgG для IdeS и N240, показаны на Фигуре 7. В таблице ниже показаны оценки относительной
25 активности на основе значений EC₅₀, определенных из кривых доза-эффект.

Таблица 4: Относительную активность расщепления IgG в сыворотке оценивали по значениям EC₅₀

№ образца	ID образца	Относительная активность (%) в сыворотке Планшет 1	Относительная активность (%) в сыворотке Планшет 2	Относительная активность (%) в сыворотке Средняя величина
Эталон	IdeS	100	100	100
1	N240	151	132	142
2	N240 (отдельные разведения)	137	146	142

30 Краткий итог:

5 N240 активен в сыворотке крови. Активность N240 в буферном растворе, как было показано в предыдущих примерах, примерно в четыре раза выше, чем активность имплицидазы, но эта разница меньше, когда два фермента сравнивают в сыворотке. В анализе активности MSD N240 по-прежнему демонстрировал существенное увеличение активности в отношении IgG человека в сыворотке по сравнению с IdeS (~142%).

Пример 6 – Уровни ADA N240 и IdeS у здоровых людей

10

Следовали общему протоколу MSD, описанному в Примере 5, за исключением следующего.

15 Планшеты MSD с несколькими матрицами покрывали 20 мкг/мл N240 или IdeS. Планшеты блокировали рыбьим желатином перед инкубацией с сывороткой (разведение 1:100) здоровых людей (n = 40) и одним пулом человеческой сыворотки (n = 100). Реагент для обнаружения представлял собой F(ab')₂-био антитело, специфичное к человеческому F(ab')₂ (JAX, 109-066-097) вместе со стрептавидином - сульфидом (MSD # R32AD-1). После добавления буфера для считывания (MSD #R92TC-2) планшеты считывали с помощью MSD QuickPlex SQ 120.

20

Результаты представлены на Фигуре 8. Этот результат показывает, что уровни ADA против N240 ниже, чем уровни ADA против IdeS.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью цистеин-протеазы IgG и содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая представляет собой:

(i) SEQ ID NO: 1; или

(ii) SEQ ID NO: 2; или

(iii) вариант SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, который имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 соответственно, при условии, что указанная последовательность сохраняет: (a) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 95 SEQ ID NO: 5, (b) аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует положению 99 SEQ ID NO: 5, и (c) аспарагин (N) в положении, которое соответствует положению 226 SEQ ID NO: 5, и при условии, что указанный полипептид по меньшей мере столь же эффективен в расщеплении IgG человека, как и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2 соответственно, при измерении в том же анализе.

2. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из модификаций в (iii) не приводит к той же самой аминокислоте, которая присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3, предпочтительно отличающийся тем, что все модификации в (iii) не приводят к той же самой аминокислоте, которая присутствует в соответствующем положении в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3.

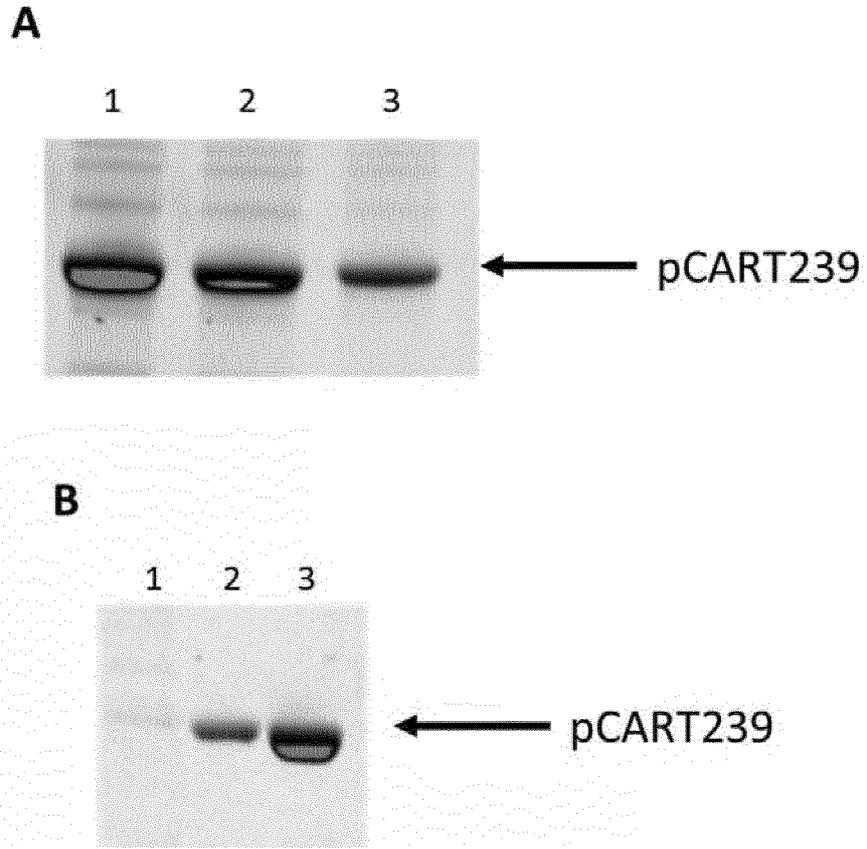
3. Полипептид по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный полипептид также включает дополнительный метионин на N-конце и/или гистидиновую метку на C-конце.

4. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид более эффективен в расщеплении IgG человека, чем полипептид IdeZ, и/или по меньшей мере так же эффективен в расщеплении IgG человека, как и полипептид IdeS, при измерении в том же анализе.

5. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид более эффективен в расщеплении IgG человека, чем полипептид IdeS, при измерении в том же анализе, при этом необязательно эффективность измеряют *in vitro* в образце крови или сыворотки, взятом у субъекта-человека.

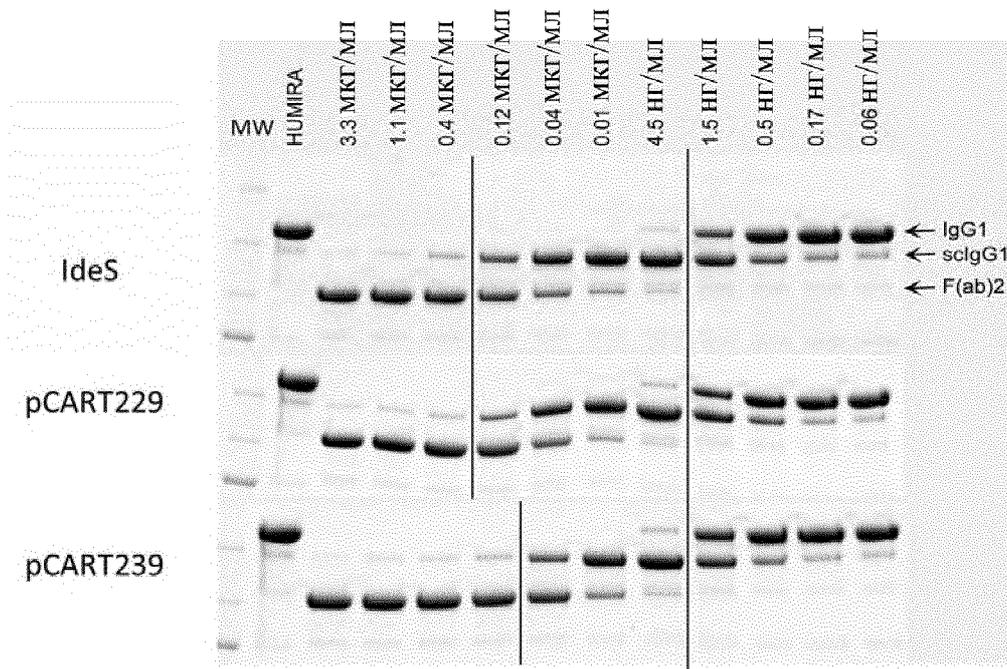
6. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что указанный полипептид по меньшей мере в 1,2 раза, предпочтительно в 1,3 раза, наиболее предпочтительно в 1,4 раза более эффективен в расщеплении IgG человека, чем полипептид IdeS, при измерении в том же анализе.
7. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид является менее иммуногенным, чем полипептид IdeS, и/или не более иммуногенным, чем полипептид IdeZ, при измерении в том же анализе.
8. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид является менее иммуногенным, чем полипептид IdeS, предпочтительно при этом иммуногенность полипептида составляет не более 85% от иммуногенности полипептида IdeS при измерении в том же анализе.
9. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из предшествующих пунктов.
10. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 9.
11. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 9 или вектор экспрессии по п. 10, которая предпочтительно представляет собой бактериальную клетку, наиболее предпочтительно клетку *E.coli*.
12. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-8 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.
13. Полипептид по любому из пп. 1-8 для применения при лечении человека или животного.
14. Способ предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту полипептида по любому из пп. 1-8 или композиции по п. 12 в профилактически или терапевтически эффективном количестве.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанное заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, полностью или частично опосредованное патогенными антителами IgG, причем предпочтительно указанное заболевание или состояние перечислены в таблице D.

16. Способ расщепления IgG *ex vivo*, включающий приведение образца, содержащего IgG, в контакт с полипептидом по любому из пп. 1-8 в условиях, которые позволяют проявлять активность цистеин-протеазы IgG.
17. Способ по п. 16, который осуществляют для получения фрагментов Fc, Fab и/или F(ab')₂.
18. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что образец представляет собой образец крови, взятый у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, как определено в п. 15.

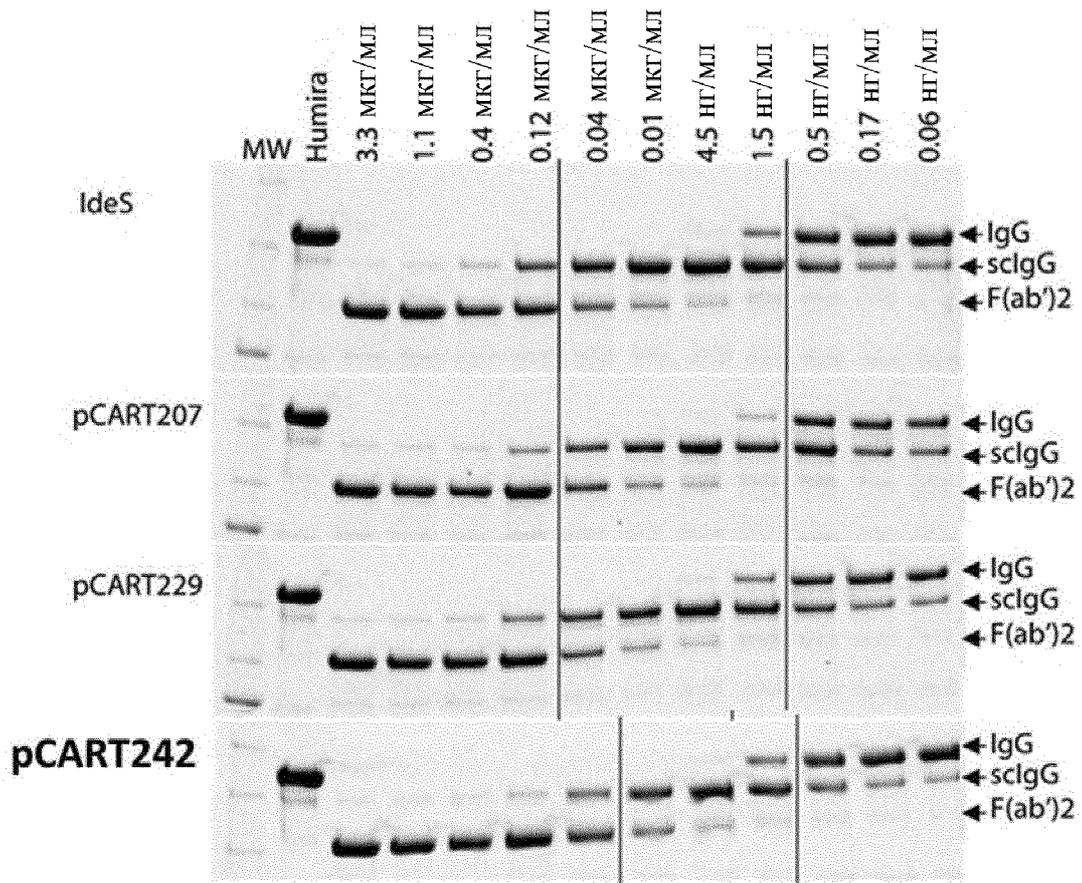


ФИГ. 1

A

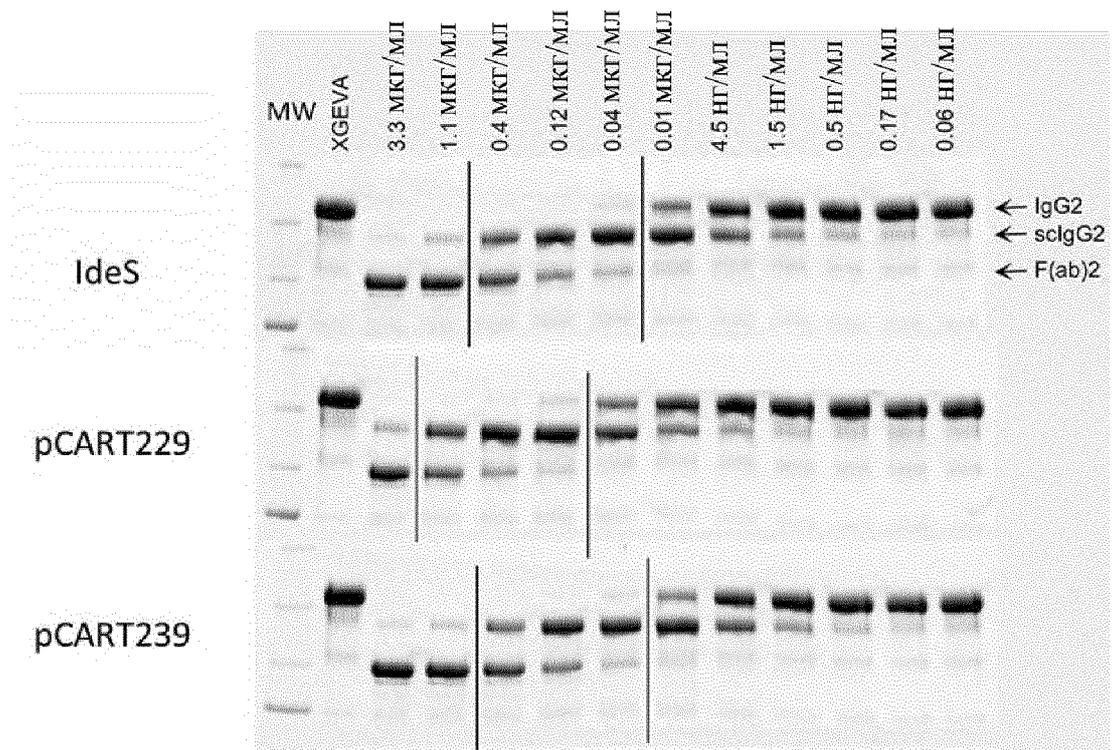


B

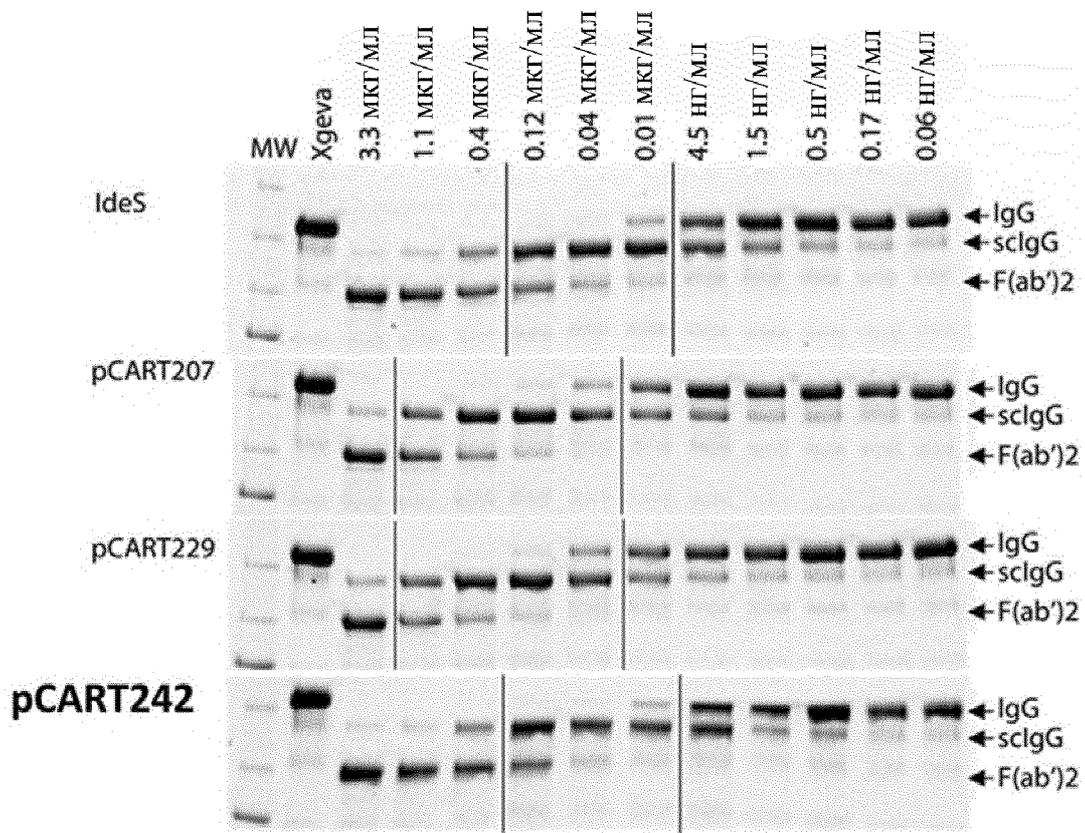


ФИГ. 2

A

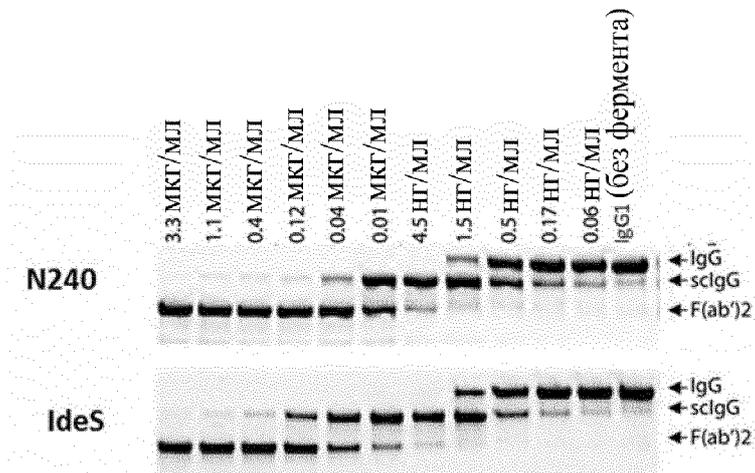


B

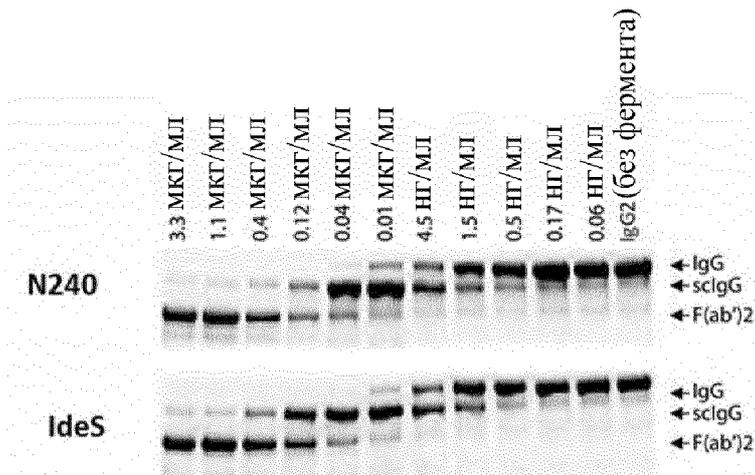


ФИГ. 3

A

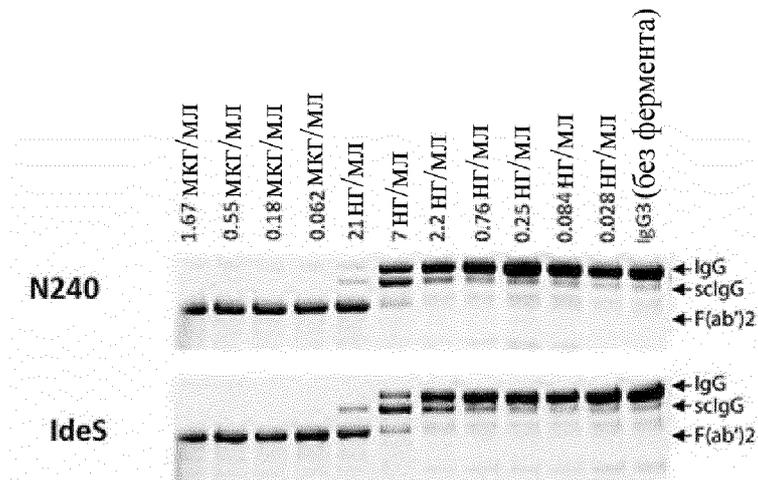


B

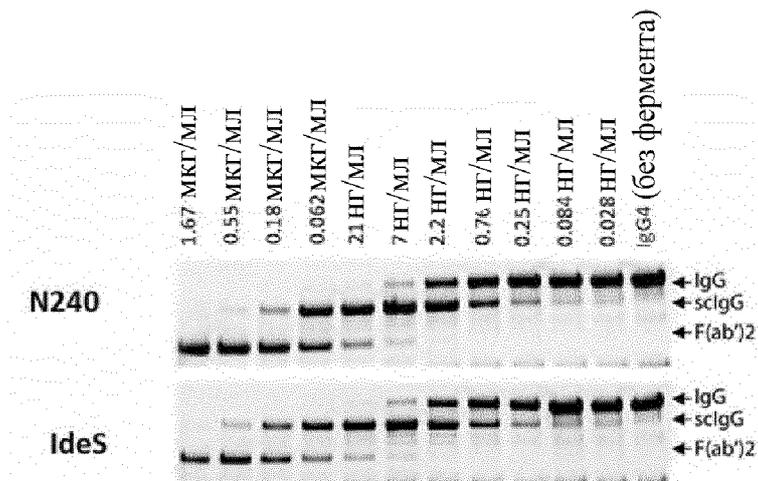


ФИГ. 4

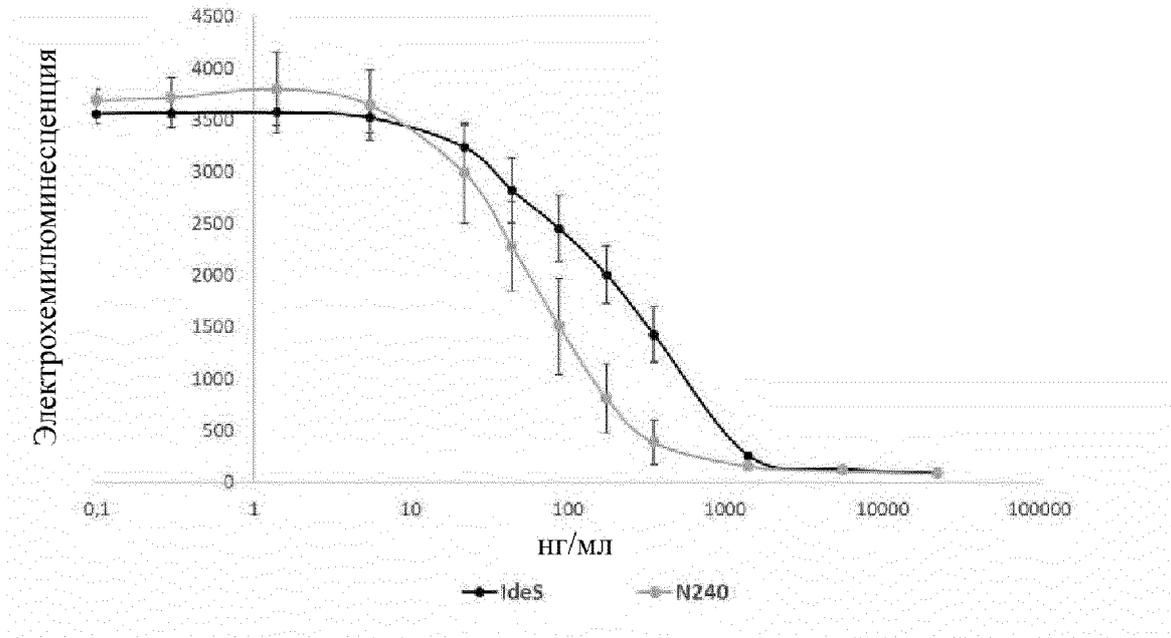
C



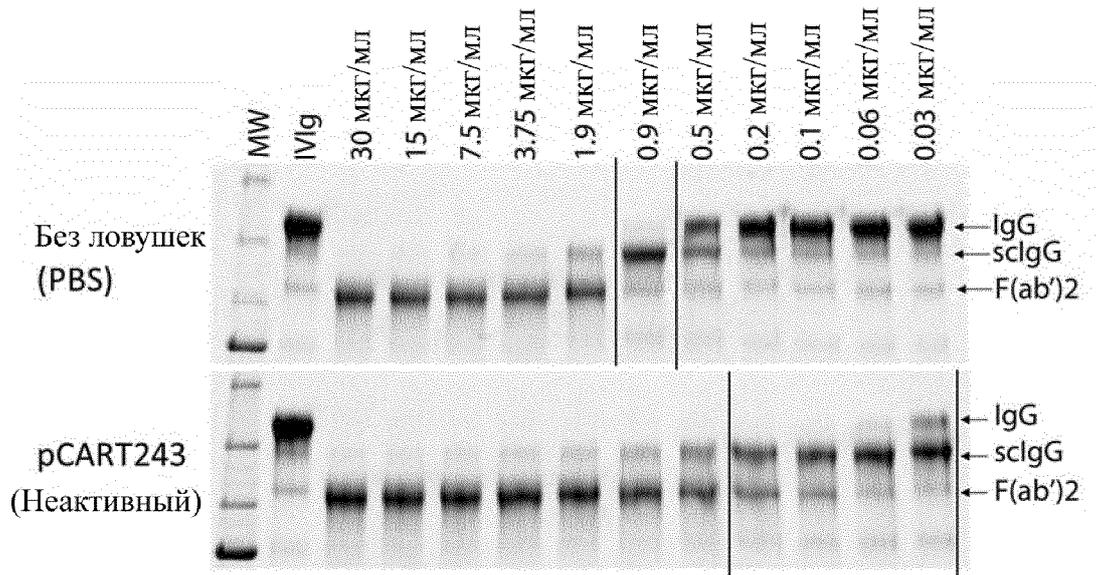
D



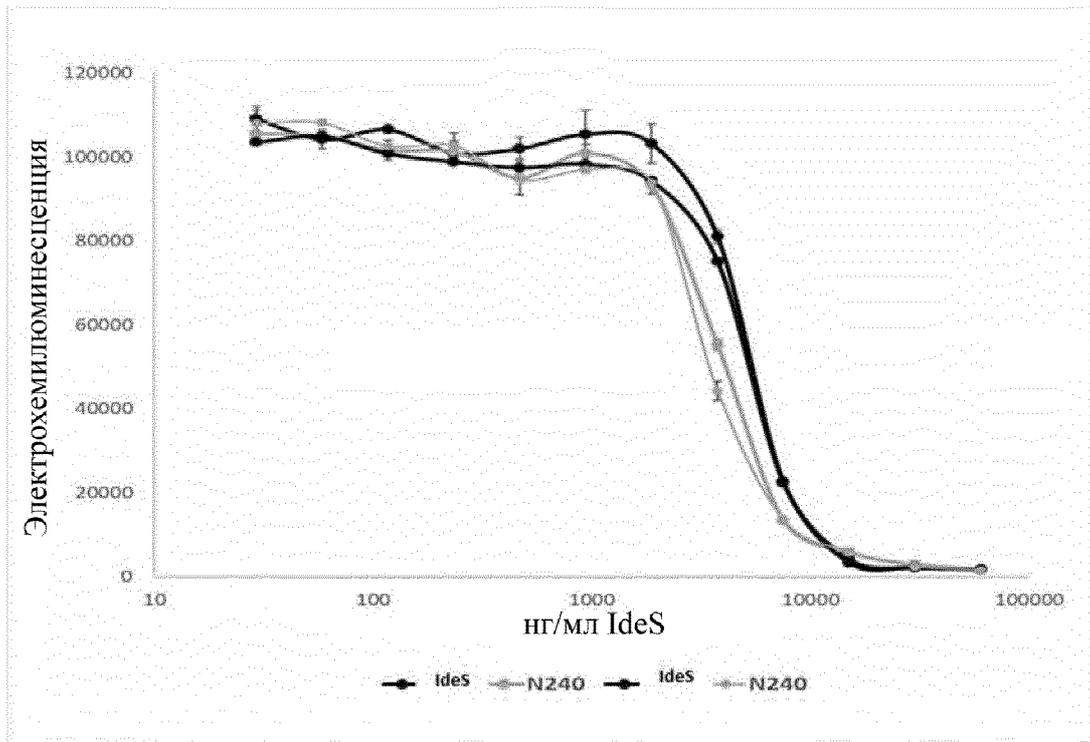
ФИГ. 4 (продолжение)



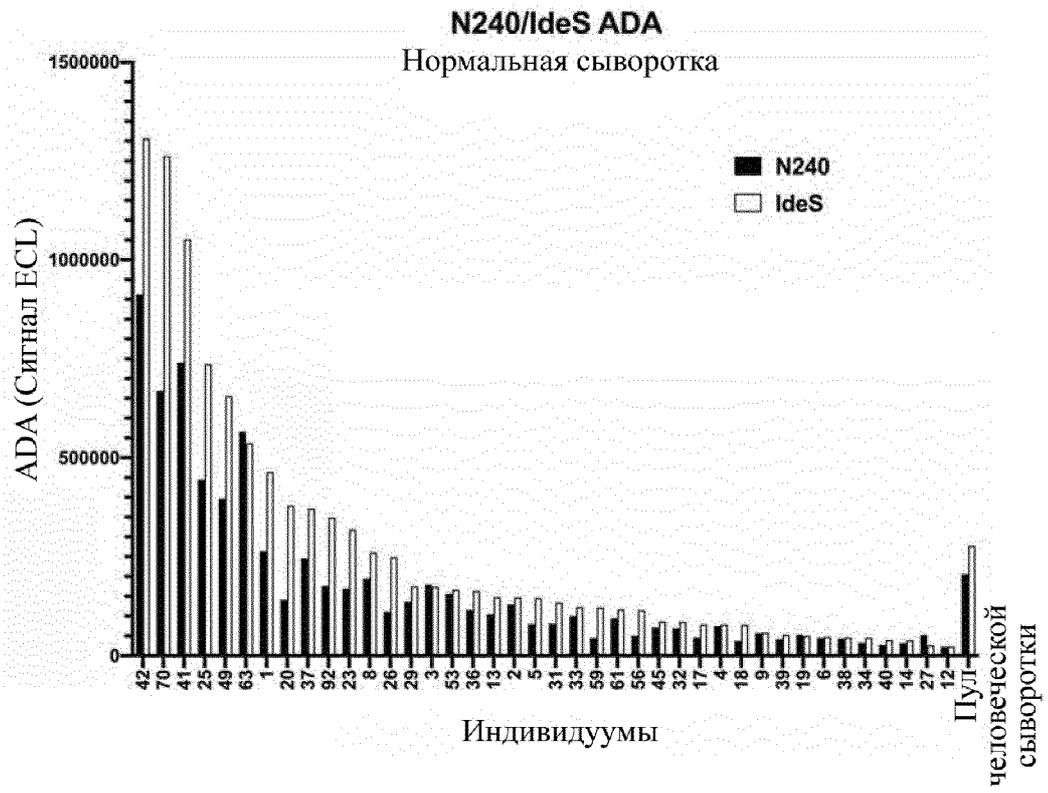
ФИГ. 5



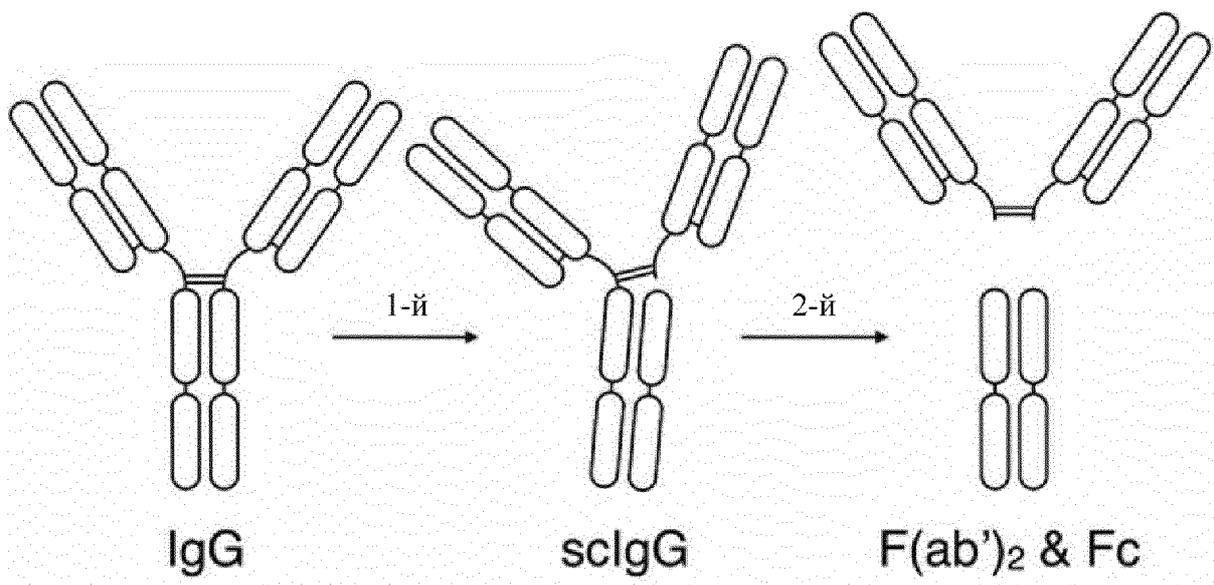
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9