

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390623 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.14

(51) Int. Cl. A61K 38/00 (2006.01)  
C12N 9/00 (2006.01)  
C12N 15/00 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.08.18

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ СВИНОЙ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭЛАСТАЗЫ

(31) 63/067,058

(72) Изобретатель:  
Петрасси Хэнк Майкл Джеймс (US)

(32) 2020.08.18

(33) US

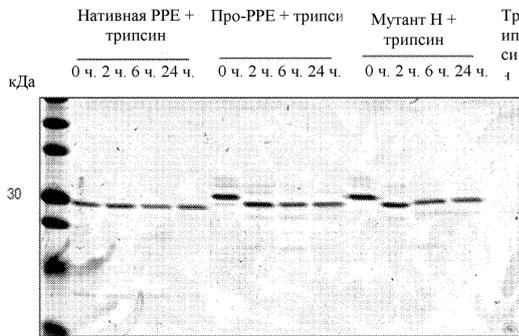
(74) Представитель:  
Кузнецова С.А. (RU)

(86) PCT/US2021/046453

(87) WO 2022/040281 2022.02.24

(71) Заявитель:  
ОНЧИЛЛЕС ФАРМА, ИНК. (US)

(57) Представлены модифицированные белки свиной панкреатической эластазы (PPE), в том числе пробелки, содержащие по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое уменьшает связывание с ингибиторами сериновой протеазы, такими как альфа-1-антитрипсин (A1AT), тем самым повышая активность уничтожения раковых клеток, и связанные с ними фармацевтические композиции, а также способы применения для лечения таких заболеваний, как различные формы рака.



A1

2023906203

202390623

A1

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ СВИНОЙ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭЛАСТАЗЫ

### ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке испрашивается преимущество в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) в отношении заявки США № 63/067058, поданной 18 августа 2020 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

### ЗАЯВЛЕНИЕ О ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, ассоциированный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо

бумажной копии и включен в данный документ посредством ссылки. Название текстового файла,

содержащего перечень последовательностей: OPNI\_001\_01WO\_ST25.txt.

Текстовый файл имеет размер приблизительно 29 КБ,

создан 16 августа 2021 года и подается в электронном виде через систему EFS-Web.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

#### *Область техники*

Данное изобретение относится к модифицированным белкам свиной панкреатической эластазы (PPE), в том числе пробелкам, содержащим по меньшей мере одно аминокислотное изменение, которое уменьшает связывание с ингибиторами сериновой протеазы, такими как альфа-1-антитрипсин (A1AT), тем самым повышая активность уничтожения раковых клеток, и к связанным с ними фармацевтическим композициям, а также способам применения для лечения таких заболеваний, как различные формы рака.

#### *Описание предшествующего уровня техники*

Прецизионная медицина, которая предназначена для оптимизации эффективности или терапевтического эффекта для определенных групп пациентов с помощью генетического или молекулярного профилирования, приобрела огромную популярность для лечения рака. Выявление конкретных геномных аномалий, которые (i) создают риск развития рака, (ii) влияют на опухолевый рост и (iii) регулируют метастазирование, определило то, как диагностируется рак, определило то, как разрабатываются и внедряются виды нацеленной терапии, и сформировало стратегии предупреждения рака.

Потребность в прецизионной медицине при раке в значительной степени основана на невозможности выявить служащие в качестве целей свойства опухолевых клеток, которые отличают их от здоровых нераковых клеток. Действительно, хотя облучение и/или химиотерапия обладают способностью эффективно уничтожать многие, если не большинство раковых клеток, их эффективность сильно ограничена цитотоксическими эффектами, оказываемыми на нераковые клетки. Такие результаты демонстрируют, что быстрое деление клеток, свойство, на которое направлена лучевая терапия и химиотерапия, недостаточно характерное именно для раковых клеток для достижения специфичности, необходимой для ограничения обширных побочных эффектов.

Было показано, что некоторые ферменты эластазы селективно токсичны в отношении раковых клеток, но относительно нетоксичны в отношении нормальных или здоровых клеток (см., например, WO 2018/232273). Тем не менее, в данной области техники остается потребность в выявлении оптимальных ферментов, которые способны к такой селективной токсичности в отношении раковых клеток, и уточнении клинической применимости таких ферментов.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ**

Варианты осуществления настоящего изобретения включают модифицированный белок свиной панкреатической эластазы (PPE), содержащий по меньшей мере одно аминокислотное изменение относительно белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4), где по меньшей мере одно изменение относится к остатку, выбранному из одного или более из Q211, T55, D74, R75, S214, R237 и N241, при этом нумерация остатков

определена по SEQ ID NO: 1 (пробелок PPE дикого типа). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно аминокислотное изменение выбрано из одного или более из Q211F, T55A, D74A, R75A, R75E, Q211A, S214A, R237A, N241A и N241Y, при этом нумерация остатков определена по SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентична последовательности, выбранной из таблицы S2, и которая сохраняет по меньшей мере одно аминокислотное изменение. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE выбран из:

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 5 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211F;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 6 и которая сохраняет аминокислотную замену T55A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 7 и которая сохраняет аминокислотную замену N241A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 8 и которая сохраняет аминокислотную замену N241Y;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей

мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 9 и которая сохраняет аминокислотную замену R75A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 10 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 10 и которая сохраняет аминокислотную замену R75E;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 11 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 11 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 12 и которая сохраняет аминокислотную замену R237A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 13 и которая сохраняет аминокислотную замену S214A; и

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 14 и которая сохраняет аминокислотную замену D74A.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток относительно активности белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток, которая приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность уничтожения раковых клеток белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4). В

некоторых вариантах осуществления повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в отсутствие человеческого белка A1AT *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в присутствии человеческого белка A1AT *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE характеризуется пониженным связыванием или взаимодействием с человеческим белком альфа-1-антитрипсином (A1AT) относительно белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE характеризуется пониженным связыванием с человеческим A1AT, которое в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше ниже связывания белка PPE дикого типа с человеческим белком A1AT. В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000% или больше активности сериновой протеазы у PPE дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью сериновой протеазы по сравнению с PPE дикого типа. В некоторых вариантах осуществления активность сериновой протеазы в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность сериновой протеазы у PPE дикого типа при измерении в отсутствие человеческого белка A1AT. В некоторых вариантах осуществления активность сериновой протеазы в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность сериновой протеазы у PPE дикого типа при измерении в присутствии человеческого белка A1AT.

Определенные варианты осуществления предусматривают модифицированный пробелок PPE, содержащий в ориентации от N-конца к C-концу сигнальный пептид (необязательно SEQ ID NO: 2), активационный пептид (необязательно SEQ ID NO: 3) и модифицированный белок PPE, который описан в данном документе, где

модифицированный пробелок PPE может активироваться посредством расщепления протеазой активационного пептида с образованием ферментативно активного модифицированного белка PPE.

Также предусмотрены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированный белок или пробелок PPE, описанные в данном документе, вектор, содержащий рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, или клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор. Некоторые варианты осуществления предусматривают способы получения модифицированного белка или пробелка PPE, описанные в данном документе, предусматривающие культивирование клетки-хозяина в условиях культивирования, подходящих для экспрессии модифицированного белка или пробелка PPE, и выделение модифицированного белка или пробелка PPE из культуры.

Некоторые варианты осуществления предусматривают фармацевтические композиции, содержащие модифицированный белок или пробелок PPE, описанные в данном документе, или экспрессируемый полинуклеотид, кодирующий модифицированный белок или пробелок PPE, и фармацевтически приемлемый носитель. Также предусмотрены способы лечения, облегчения симптомов и/или уменьшения прогрессирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой первичный рак или метастатический рак и выбран из одного или более из меланомы (необязательно метастатической меланомы), рака молочной железы (необязательно трижды негативного рака молочной железы, TNBC), рака почки (необязательно почечно-клеточной карциномы), рака поджелудочной железы, рака кости, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мезотелиомы, лейкоза (необязательно лимфолейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза или рецидивирующего острого миелоидного лейкоза), множественной миеломы, лимфомы, гепатомы (гепатоклеточной карциномы), саркомы, В-клеточного злокачественного новообразования, рака яичников, колоректального рака, глиомы,

мультиформной глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, первичной лимфомы ЦНС, примитивной нейроэктодермальной опухоли (медуллобластомы), рака мочевого пузыря, рака матки, рака пищевода, рака головного мозга, различных форм рака головы и шеи, рака шейки матки, рака яичка, рака щитовидной железы и рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит модифицированный пробелок PPE, который активируется в результате расщепления протеазой активационного пептида в раковой ткани или месте локализации опухоли нуждающегося в этом субъекта с образованием ферментативно активного модифицированного белка PPE. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции увеличивает уничтожение раковых клеток у субъекта в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше относительно контроля или эталона. В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции приводит к регрессии опухоли у субъекта, на что необязательно указывает статистически значимое уменьшение величины жизнеспособной опухоли или опухолевой массы, необязательно уменьшение опухолевой массы на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или больше.

Определенные варианты осуществления включают введение субъекту фармацевтической композиции путем парентерального введения или внутриопухолевого введения. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение представляет собой внутривенное введение.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На **фиг. 1A-1D** показано эффективное расщепление трипсином пробелков PPE дикого типа и модифицированных пробелков PPE. Как показано на **фиг. 1A**, инкубация нативной PPE (с активным пептидазным доменом PPE) с трипсином не приводила к появлению более низкомолекулярных бэндов, что свидетельствует о том, что трипсин не расщепляет формы белка PPE после первоначального превращения в активную PPE.

На **фиг. 2А-2В** показана повышенная ферментативная активность пробелков PPE дикого типа и модифицированных пробелков PPE после расщепления трипсином и превращения в активную PPE.

На **фиг. 3А-3В** показана активность в отношении раковых клеток активных форм белков PPE дикого типа и модифицированных белков PPE. На **фиг. 3А** показана активность возрастающих доз тестируемых белков, а на **фиг. 3В** показана активность тестируемых белков в отсутствие или в присутствии возрастающих количеств ингибитора сериновой протеазы А1АТ.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при реализации на практике или при тестировании предмета настоящего изобретения могут быть использованы любые способы, материалы, композиции, реагенты, клетки, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации и ссылки, в том числе без ограничения патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или ссылка были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки как полностью изложенные. Любая патентная заявка, в отношении которой испрашивается приоритет данная заявка, также во всей своей полноте включена в данный документ посредством ссылки способом, который описан выше для публикаций и ссылок.

Для синтеза рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидов, а также культивирования и трансформации тканей (например, электропорации, липофекции) можно применять стандартные методики. Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии со спецификациями производителя или как это обычно делается в данной области техники или как описано в данном документе. Такие и родственные методики и процедуры, как правило, можно осуществлять в

соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые упомянуты и рассмотрены в настоящем описании. Если не представлены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с молекулярной биологией, аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, а также лабораторные процедуры и методики, описанные в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Для рекомбинантной технологии, молекулярно-биологических, микробиологических, химических синтезов, химических анализов, получения фармацевтических препаратов, составов и их доставки, а также лечения пациентов можно применять стандартные методики.

В контексте настоящего изобретения следующие термины имеют представленные ниже определения.

Формы единственного числа используются в данном документе для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «элемент» включает «один элемент», «один или более элементов» и/или «по меньшей мере один элемент».

Под «приблизительно» подразумевается количество, уровень, значение, число, частота, процент, величина, размер, степень, вес или длина, которые варьируют на вплоть до 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% к эталонному количеству, уровню, значению, количеству, частоте, проценту, величине, размеру, степени, весу или длине.

«Антагонист» относится к биологической структуре или химическому средству, которые препятствуют или иным образом снижают физиологическое действие другого средства или другой молекулы. В некоторых случаях антагонист специфически связывается с другим средством или другой молекулой. Включены полные и частичные антагонисты.

«Агонист» относится к биологической структуре или химическому средству, которые увеличивают или усиливают физиологическое действие другого средства

или другой молекулы. В некоторых случаях агонист специфически связывается с другим средством или другой молекулой. Включены полные и частичные агонисты.

Используемый в данном документе термин «аминокислота» предназначен для обозначения как встречающихся в природе, так и не встречающихся в природе аминокислот, а также аналогов и миметиков аминокислот. К встречающимся в природе аминокислотам относятся 20 (L)-аминокислот, используемых во время биосинтеза белка, а также другие, такие как, например, 4-гидроксипролин, гидроксизин, десмозин, изодесмозин, гомоцистеин, цитруллин и орнитин. К не встречающимся в природе аминокислотам относятся, например, (D)-аминокислоты, норлейцин, норвалин, п-фторфенилаланин, этионин и другие, которые известны специалисту в данной области техники. К аналогам аминокислот относятся модифицированные формы встречающихся в природе и не встречающихся в природе аминокислот. К таким модификациям могут относиться, например, замена или замещение химических групп и фрагментов аминокислоты или дериватизация аминокислоты. К миметикам аминокислот относятся, например, органические структуры, которые характеризуются функционально сходными свойствами, такими как характеристики заряда и расстояния между зарядами эталонной аминокислоты. Например, органическая структура, которая имитирует аргинин (Arg или R), будет иметь фрагмент с положительным зарядом, расположенный в аналогичном молекулярном пространстве и имеющий ту же степень подвижности, что и  $\epsilon$ -аминогруппа боковой цепи встречающейся в природе аминокислоты Arg. Миметики также включают структуры, ограниченные так, чтобы поддерживалось оптимальное расстояние и взаимодействие зарядов аминокислоты или функциональных групп аминокислоты. Специалистам в данной области известно или они смогут определить, какие структуры представляют собой функционально эквивалентные аналоги аминокислот и миметики аминокислот.

Используемая в данном документе фраза субъект, «подверженный риску» развития заболевания или нежелательной реакции, может иметь или не иметь обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания, а также у него может проявляться или не проявляться обнаруживаемое заболевание или симптомы

заболевания до применения описанных в данном документе способов лечения. «Подверженный риску» означает наличие у субъекта одного или более факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, коррелирующие с развитием заболевания, как описано в данном документе и известно из уровня техники. Субъект, имеющий один или более из таких факторов риска, имеет более высокую вероятность развития заболевания или нежелательной реакции, чем субъект без одного или более из таких факторов риска.

«Биосовместимый» относится к материалам или соединениям, которые, как правило, не наносят вреда биологическим функциям клетки или субъекта и не приводят к какой-либо степени неприемлемой токсичности, в том числе аллергическим и болезненным состояниям.

Термин «связывание» относится к прямой ассоциации между двумя молекулами вследствие, например, ковалентных, электростатических, гидрофобных и ионных и/или водородных взаимодействий, в том числе таких взаимодействий, как солевые мостики и водные мостики.

Под «кодирующей последовательностью» понимают любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая вносит вклад в код полипептидного продукта гена. В противоположность этому, термин «некодирующая последовательность» относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая не вносит непосредственный вклад в код полипептидного продукта гена.

На протяжении всего настоящего изобретения, если контекст не требует иного, слова «содержать», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие включение указанной стадии, или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов.

Под «состоящим из» подразумевается включение всего, что следует за фразой «состоящий из», и ограничение только перечисленным. Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что не могут присутствовать никакие другие

элементы. Под «по сути состоящим из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после фразы, и ограниченное до других элементов, которые не препятствуют или не способствуют активности или действию, указанному в настоящем изобретении для перечисленных элементов. Таким образом, фраза «по сути состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, а другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, оказывают ли они существенное влияние на активность или действие перечисленных элементов.

Термин «не содержащий эндотоксин» или «практически не содержащий эндотоксин» относится, как правило, к композициям, растворителям и/или содержимому сосудов, которые содержат по большей мере следовые количества (например, количества, не оказывающие клинически неблагоприятных физиологических эффектов на субъекта) эндотоксина и предпочтительно не поддающиеся обнаружению количества эндотоксина. Эндотоксины представляют собой токсины, ассоциируемые с некоторыми микроорганизмами, такими как бактерии, обычно грамотрицательные бактерии, хотя эндотоксины могут быть обнаружены и в грамположительных бактериях, таких как *Listeria monocytogenes*. Наиболее распространенными эндотоксинами являются липополисахариды (LPS) или липоолигосахариды (LOS), обнаруживаемые во внешней мембране различных грамотрицательных бактерий и представляющие собой центральную патогенную особенность способности таких бактерий вызывать заболевание. Небольшие количества эндотоксина помимо прочих неблагоприятных физиологических эффектов у людей могут вызывать лихорадку, снижение кровяного давления и активацию воспаления и коагуляции.

Поэтому в фармацевтическом производстве зачастую необходимо удалять большую часть или все следы эндотоксина из лекарственных препаратов и/или контейнеров с лекарственными средствами, поскольку даже небольшие количества могут вызывать у людей неблагоприятные эффекты. С этой целью можно использовать печь для депирогенизации, поскольку для расщепления большинства эндотоксинов обычно требуется температура выше 300°C. Например, при

использовании первичных упаковочных материалов, таких как шприцы или флаконы, сочетания температуры стекла 250°C и времени выдержки 30 минут зачастую бывает достаточным для достижения 3-кратного логарифмического снижения уровней эндотоксинов. Предусмотрены и другие способы удаления эндотоксинов, в том числе, например, хроматографические и фильтрационные способы, которые описаны в данном документе и известны из уровня техники.

Эндотоксины могут быть обнаружены с помощью стандартных методик, известных из уровня техники. Например, для обнаружения присутствия эндотоксина очень чувствительным анализом является анализ с применением лизата амебоцитов *Limulus*, в котором используют кровь мечехвоста. В данном тесте очень низкие уровни LPS могут вызвать поддающуюся обнаружению коагуляцию лизата *Limulus* по причине мощного ферментативного каскада, который усиливает данную реакцию. Эндотоксины также можно количественно оценить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для того, чтобы эндотоксин практически не содержался, уровни эндотоксина могут быть ниже чем приблизительно 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ЕЭ/мг активного соединения. Обычно 1 нг липополисахарида (LPS) соответствует приблизительно 1-10 ЕЭ.

Термин «полумаксимальная эффективная концентрация» или « $EC_{50}$ » относится к концентрации средства (например, модифицированной PPE), как описано в данном документе, при которой оно индуцирует ответ наполовину между исходным уровнем и максимумом после некоторого определенного времени воздействия; таким образом,  $EC_{50}$  ступенчатой кривой зависимости дозы от эффекта представляет собой концентрацию соединения, при которой наблюдается 50% от его максимального эффекта.  $EC_{50}$  также представляет собой концентрацию в плазме крови, необходимую для достижения 50% максимального эффекта *in vivo*. Аналогично, « $EC_{90}$ » относится к концентрации средства или композиции, при которой наблюдается 90% от его максимального эффекта. « $EC_{90}$ » можно рассчитать из « $EC_{50}$ » и углового коэффициента уклона или его можно определить непосредственно из данных, используя стандартные сведения из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления  $EC_{50}$  средства (например, модифицированной

PPE) составляет менее чем приблизительно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления средство будет иметь значение EC<sub>50</sub> приблизительно 1 нМ или менее.

«Период полужизни» средства, такого как модифицированная PPE, может относиться к времени, которое требуется для того, чтобы средство потеряло половину своей фармакологической, физиологической или другой активности относительно такой активности во время введения в сыворотку крови или ткань организма или относительно любого другого определенного момента времени. «Период полужизни» может также относиться к времени, которое требуется для уменьшения количества или концентрации средства на половину от исходного количества, введенного в сыворотку крови или ткань организма, относительно такого количества или такой концентрации во время введения в сыворотку крови или ткань организма или относительно любого другого определенного момента времени. Период полужизни можно измерить в сыворотке крови и/или в любой одной или более выбранных тканях.

Термин «гетерологичный» относится к признаку или элементу (например, участку расщепления протеазой) в полипептиде или кодирующем полинуклеотиде, происходящем из источника, отличного от источника полипептида или кодирующего полинуклеотида дикого типа, например, признаку другого вида, нежели дикий тип, или неприродному сконструированному признаку.

Термины «модулирование» и «изменение» включают «увеличение», «усиление» или «стимулирование», а также «уменьшение» или «понижение», как правило, в статистически значимом или физиологически значимом количестве или степени по сравнению с контролем. «Увеличенное», «простимулированное» или «повышенное» количество обычно является «статистически значимым» количеством и может включать увеличение, которое в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 раз больше, чем количество, производимое без композиции (например, в условиях отсутствия средства) или производимое контрольной композицией. «Уменьшенное» или «сниженное»

количество обычно является «статистически значимым» количеством и может включать снижение, которое приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 раз меньше, чем количество, производимое без композиции (например, в условиях отсутствия средства) или производимое контрольной композицией. В данном документе описаны примеры сравнений и «статистически значимых» количеств.

Термины «полипептид», «белок» и «пептид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру аминокислот, не ограниченному какой-либо конкретной длиной. Термин «фермент» включает полипептидные или белковые катализаторы. Используемые в данном документе термины «пробелок», «профермент» или «зимоген» относятся к неактивному (или практически неактивному) белку или ферменту, который обычно активируется расщеплением протеазой активационного пептида с образованием активного белка или фермента. Термины включают такие модификации, как миристоилирование, сульфатирование, гликозилирование, фосфорилирование и добавление или удаление сигнальных последовательностей. Термины «полипептид» или «белок» означают одну или более цепей аминокислот, где каждая цепь содержит аминокислоты, ковалентно связанные пептидными связями, и где указанный полипептид или белок может содержать множество цепей, нековалентно и/или ковалентно связанных вместе пептидными связями, имеющих последовательность нативных белков, то есть белков, продуцируемых встречающимися в природе и, главным образом, нерекомбинантными клетками или генетически сконструированными или рекомбинантными клетками, и охватывают молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот нативной последовательности. В определенных вариантах осуществления полипептид представляет собой «рекомбинантный» полипептид, продуцируемый рекомбинантной клеткой, которая содержит одну или более молекул рекомбинантной ДНК, которые обычно состоят из гетерологичных полинуклеотидных последовательностей или комбинаций полинуклеотидных последовательностей, которые в ином случае нельзя было бы обнаружить в клетке.

Термин «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» включает мРНК, РНК, кРНК, кДНК и ДНК. Термин обычно относится к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, либо к рибонуклеотидам, либо к дезоксирибонуклеотидам, либо к модифицированной форме нуклеотида любого типа. Термин включает однонитевые и двухнитевые формы ДНК. Термины «выделенная ДНК», «выделенный полинуклеотид» и «выделенная нуклеиновая кислота» относятся к молекуле, которая была выделена из общей геномной ДНК конкретного вида. Таким образом, выделенный сегмент ДНК, кодирующий полипептид, относится к сегменту ДНК, который содержит одну или более кодирующих последовательностей, но в значительной степени выделен из общей геномной ДНК вида, из которого получен сегмент ДНК, или очищен от нее. Также предусмотрены некодирующие полинуклеотиды (например, праймеры, зонды, олигонуклеотиды), которые не кодируют полипептид. Также предусмотрены рекомбинантные векторы, в том числе, например, векторы экспрессии, вирусные векторы, плазмиды, космиды, фагмиды, фаги, вирусы и другие.

Дополнительные кодирующие или некодирующие последовательности могут, но не обязательно, присутствовать в полинуклеотиде, описанном в данном документе, и полинуклеотид может, но не обязательно, быть связан с другими молекулами и/или вспомогательными материалами. Следовательно, полинуклеотид или экспрессируемые полинуклеотиды, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями, например, последовательностями контроля экспрессии.

«Последовательности контроля экспрессии» включают регуляторные последовательности нуклеиновых кислот или соответствующих аминокислот, такие как промоторы, лидерные последовательности, энхансеры, интроны, мотивы распознавания для РНК- или ДНК-связывающих белков, сигналы полиаденилирования, терминаторы, внутренние участки посадки рибосом (IRES), сигналы секреции, сигналы субклеточной локализации и другие, которые обладают способностью влиять на транскрипцию или трансляцию либо субклеточную или клеточную локализацию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Иллюстративные последовательности контроля экспрессии описаны в Goeddel;

Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

«Промотор» представляет собой регуляторную область ДНК, способную связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию нижележащей (в 3'-направлении) кодирующей последовательности. В контексте данного документа промоторная последовательность ограничена на своем 3'-конце участком инициации транскрипции и проходит вверх (в 5'-направлении) с включением минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, поддающихся обнаружению выше фонового. Участок инициации транскрипции (условно определяемый путем картирования с помощью нуклеазы S1) может быть обнаружен в промоторной последовательности, а также в связывающихся с белком доменах (консенсусных последовательностях), ответственных за связывание РНК-полимеразы. Эукариотические промоторы могут часто, но не всегда, содержать «ТАТА»-боксы и «САТ»-боксы. Прокариотические промоторы содержат последовательности Шайна-Дальгарно в дополнение к консенсусным последовательностям -10 и -35.

В данной области техники хорошо известно большое количество промоторов, в том числе конститутивные, индуцируемые и репрессируемые промоторы, из множества различных источников. К репрезентативным источникам относятся, например, различные типы вирусов, клеток млекопитающих, насекомых, растений, дрожжей и бактерий, и подходящие промоторы из этих источников легко доступны или могут быть получены посредством синтеза на основе последовательностей, общедоступных в Интернете, или, например, из депозитариев, таких как ATCC, а также из других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т. е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т. е. инициировать транскрипцию либо в 3'-, либо в 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (araA), цитомегаловирусный (CMV) промотор, промотор SV40, промотор RSV. К индуцируемым промоторам относятся система Tet (патенты США 5464758 и 5814618), индуцируемая экдизоном система (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996)

93 (8): 3346-3351; система T-REx™ (Invitrogen Карлсбад, Калифорния), LacSwitch® (Stratagene, (Сан-Диего, Калифорния) и индуцируемая тамоксифеном рекомбиназная система Cre-ERT (Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324-4327; Nuc Acid. Res. (2000) 28 (23): e99, патент США № 7112715 и Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005) 308: 123-144) или любой известный в данной области техники промотор, подходящий для экспрессии в нужных клетках.

К «экспрессируемому полинуклеотиду» относятся кДНК, РНК, мРНК или другой полинуклеотид, который содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность и необязательно по меньшей мере одну последовательность контроля экспрессии, например, транскрипционный и/или трансляционный регуляторный элемент, и который может экспрессировать кодируемый полипептид (например, модифицированный пробелок PPE) при введении в клетку, например, клетку субъекта.

В некоторых вариантах осуществления экспрессируемый полинуклеотид представляет собой модифицированную РНК или модифицированный полинуклеотид мРНК, например, не встречающийся в природе аналог РНК. В определенных вариантах осуществления модифицированный полинуклеотид РНК или мРНК содержит одно или более модифицированных или не встречающихся в природе оснований, например, нуклеотидное основание, отличное от аденина (A), гуанина (G), цитозина (C), тимина (T) и /или урацила (U). В некоторых вариантах осуществления модифицированная мРНК содержит одну или более модифицированных или не встречающихся в природе межнуклеотидных связей. Экспрессируемые полинуклеотиды РНК для доставки кодируемого терапевтического полипептида описаны, например, в Kormann et al., Nat Biotechnol. 29:154-7, 2011; и заявках США №№ 2015/0111248, 2014/0243399, 2014/0147454 и 2013/0245104, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления к различным вирусным векторам, которые можно использовать для доставки экспрессируемого полинуклеотида, относятся аденовирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе вируса коровьей оспы, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и ретровирусные векторы. В некоторых случаях ретровирусный вектор представляет

собой производное мышинового или птичьего ретровируса или представляет собой лентивирусный вектор. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть вставлен один чужеродный ген, включают без ограничения: вирус мышинового лейкоза Молони (MoMuLV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), SIV, BIV, ВИЧ и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов могут включать несколько генов. Все такие векторы могут переносить или включать ген селективируемого маркера, что позволяет идентифицировать и получать трансдуцированные клетки. Посредством встраивания представляющей интерес полипептидной последовательности в вирусный вектор вместе с другим геном, который кодирует лиганд к рецептору на конкретной клетке-мишени, например, вектор можно сделать специфичным к мишени. Ретровирусные векторы можно сделать специфичными к мишени путем вставки, например, полинуклеотида, кодирующего белок. Иллюстративное нацеливание на мишень можно осуществить с помощью антитела для нацеливания на ретровирусный вектор. Специалистам в данной области техники будут известны или они смогут легко их установить без проведения излишних экспериментов конкретные полинуклеотидные последовательности, которые могут быть вставлены в ретровирусный ген с целью обеспечения специфичной доставки ретровирусного вектора к мишени.

В определенных случаях экспрессируемые полинуклеотиды, описанные в данном документе, сконструированы для локализации внутри клетки, потенциально внутри конкретного компартмента, такого как ядро, или сконструированы для секреции из клетки или транслокации к плазматической мембране клетки. В иллюстративных вариантах осуществления экспрессируемые полинуклеотиды сконструированы для ядерной локализации.

Термин «выделенный» полипептид или белок, используемый в данном документе, означает, что указанный белок (1) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми он обычно встречается в природе, (2) фактически не содержит других белков из того же источника, например, того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида, (4) был выделен по меньшей мере приблизительно на 50 процентов от полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с

которыми он связан в природе, (5) не связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с частями белка, с которыми «выделенный белок» связан в природе, (6) функционально связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (7) не встречается в природе. Такой выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК, которая может иметь синтетическое происхождение, или любой их комбинацией. В определенных вариантах осуществления выделенный белок практически не содержит белков или полипептидов или других примесей, встречающихся в его природной среде, которые могут препятствовать его применению (терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или иному).

В определенных вариантах осуществления можно определить «степень чистоты» любого заданного средства (например, модифицированной РРЕ) в композиции. Например, определенные композиции могут содержать средство, такое как полипептидное средство, которое составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% степени чистоты в пересчете на белок или в пересчете на вес, включая все десятичные дроби и промежуточные диапазоны, которую измеряют, например, и никоим образом не ограничиваясь, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), хорошо известной формы колоночной хроматографии, часто используемой в биохимии и аналитической химии для разделения, идентификации и количественной оценки соединений.

Термин «эталонная последовательность» обычно относится к кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, с которой сравнивают другую последовательность. Все полипептидные и полинуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, включены в качестве эталонных последовательностей, включая последовательности, описанные по названию, и последовательности, описанные в таблицах и Перечне последовательностей.

Определенные варианты осуществления предусматривают биологически активные «варианты» и «фрагменты» белков/полипептидов, описанных в данном документе,

а также полинуклеотиды, которые их кодируют. «Варианты» содержат одну или более замен, добавлений, делеций и/или вставок относительно эталонного полипептида или полинуклеотида (см., например, таблицы и Перечень последовательностей). Вариант полипептида или полинуклеотида содержит аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична или сходна или гомологична последовательности с эталонной последовательностью, которая описана в данном документе, и практически сохраняет активность такой эталонной последовательности. Также предусмотрены последовательности, которые состоят из эталонных последовательностей или отличаются от них добавлением, делецией, вставкой или заменой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 или более аминокислот или нуклеотидов и которые практически сохраняют по меньшей мере одну активность такой эталонной последовательности. В определенных вариантах осуществления добавления или делеции включают С-концевые и/или N-концевые добавления и/или делеции.

Термины «идентичность последовательности» или, например, «последовательность, которая на 50% идентична», используемые в данном документе, относятся к степени, с которой последовательности идентичны при понуклеотидном сравнении или при аминокислотном сравнении в интервале сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательностей» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в интервале сравнения, определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, А, Т, С, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в интервале сравнения (т. е. размер интервала) и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания интервала сравнения можно произвести с

помощью компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Висконсин, США) или путем инспектирования и наилучшего выравнивания (т. е. приводящего к наибольшему проценту гомологии в интервале сравнения), полученного любым из различных выбранных способов. Также можно упомянуть семейство программ BLAST, которое, например, раскрыто у Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997.

Термин «растворимость» относится к свойству описанного в данном документе средства (например, модифицированной PPE) растворяться в жидком растворителе и образовывать гомогенный раствор. Растворимость обычно выражают в виде концентрации либо по массе растворенного вещества на единицу объема растворителя (г растворенного вещества на кг растворителя, г на дл (100 мл), мг/мл и т. д.), либо молярности, либо моляльности, либо мольной доли, либо других подобных описаний концентрации. Максимальное равновесное количество растворенного вещества, которое может раствориться в количестве растворителя, представляет собой растворимость такого растворенного вещества в данном растворителе при определенных условиях, включая температуру, давление, pH и природу растворителя. В определенных вариантах осуществления растворимость измеряют при физиологическом pH или другом pH, например, при pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 7,4, pH 7,6, pH 7,8 или pH 8,0 (например, приблизительно pH 5-8). В определенных вариантах осуществления растворимость измеряют в воде или физиологическом буфере, таком как PBS или NaCl (с  $\text{NaPO}_4$  или без нее). В конкретных вариантах осуществления растворимость измеряют при относительно более низком pH (например, pH 6,0) и относительно более высоком уровне содержания соли (например, 500 мМ NaCl и 10 мМ  $\text{NaPO}_4$ ). В определенных вариантах осуществления растворимость измеряют в биологической жидкости (растворителе), такой как кровь или сыворотка крови. В определенных вариантах осуществления температура может быть приблизительно комнатной температурой (например, приблизительно 20, 21, 22, 23, 24, 25°C) или приблизительно температурой тела (37°C). В определенных вариантах осуществления средство имеет растворимость по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл при комнатной температуре или при 37°C.

«Субъект», или «нуждающийся в этом субъект», или «пациент», или «нуждающийся в этом пациент» включает субъекта-млекопитающего, такого как субъект-человек.

«Практически» или «по сути» означает почти целиком или полностью, например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше от некоторого заданного количества.

Под «статистически значимым» подразумевается, что результат вряд ли возник случайно. Статистическую значимость можно определить любым способом, известным из уровня техники. К обычно используемым показателям значимости относятся р-значение, которое представляет собой частоту или вероятность, с которой произошло бы наблюдаемое событие, если нулевая гипотеза была верна. Если полученное р-значение меньше уровня значимости, то нулевую гипотезу отвергают. В простых случаях уровень значимости определяют как р-значение, равное 0,05 или меньше.

«Терапевтический ответ» относится к уменьшению симптомов (независимо от того, является ли оно устойчивым) в результате введения одного или более терапевтических средств.

Используемые в данном документе термины «терапевтически эффективное количество», «терапевтическая доза», «профилактически эффективное количество» или «диагностически эффективное количество» обозначает количество средства (например, модифицированного белка PPE), необходимое для того, чтобы вызвать требуемый биологический ответ после введения.

Используемый в данном документе термин «лечение» субъекта (например, млекопитающего, такого как человек) или клетки обозначает любой тип вмешательства, используемый в попытке изменить естественное течение болезни индивидуума или клетки. Лечение включает без ограничения введение фармацевтической композиции, и его можно проводить либо профилактически, либо после начала патологического события или контакта с возбудителем

заболевания. Также предусмотрены «профилактические» методы лечения, которые могут быть направлены на снижение скорости прогрессирования подвергнутого лечению заболевания или патологического состояния, отсрочку начала такого заболевания или патологического состояния или уменьшение степени тяжести его начала. «Лечение» или «профилактика» не обязательно означает полное искоренение, излечение или предупреждение заболевания или патологического состояния или связанных с ними симптомов.

Термин «дикий тип» относится к гену или продукту гена (например, полипептиду), который чаще всего наблюдается в популяции и, таким образом, произвольно сконструирован как «нормальная» или «дикого типа» форма гена.

Каждый вариант осуществления в данном описании должен быть применим к любому другому варианту осуществления, если прямо не указано иное.

### **Модифицированные белки PPE**

Варианты осуществления настоящего изобретения включают модифицированные белки свиной панкреатической эластазы (PPE), содержащие по меньшей мере одно аминокислотное изменение относительно белка PPE дикого типа (например, SEQ ID NO: 4), в том числе изменения по одному или более остаткам Q211, T55, D74, R75, S214, R237 и/или N241, при этом нумерация определена по SEQ ID NO: 1 (пробелок PPE дикого типа). Панкреатические эластазы, такие как PPE, представляют собой класс сериновых протеаз, которые продуцируются в виде неактивного зимогена (или пробелка, профермента), состоящего из сигнального пептида, активационного пептида и пептидазного домена. Пробелок PPE дикого типа активируется в результате расщепления трипсином активационного пептида с высвобождением ферментативно активного пептидазного домена PPE или белка PPE. Аминокислотные последовательности PPE дикого типа и его доменов представлены в таблице S1.

**Таблица S1. Последовательности PPE дикого типа**

Название	Последовательность	SEQ ID
----------	--------------------	--------

		NO:
Пробелок PPE WT, сигнальный пептид выделен подчеркиванием	<u>MLRLLVVASLVLYGHSTQDFPETNAR</u> VVGGT EAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIRQ NWVMTAAHCVDRELTFRVVVGEHNLNQNDG TEQYVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLR LAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITG WGLTRTNGQLAQTLQQAYLPTVDYAISSSSY WGSTVKNSMVCAGGDGVRSGCQGDSGGPLH CLVNGQYAVHGVTSFVSRLGCNVTRKPTVFT RVSAYISWINNVIASN	1
Сигнальный пептид PPE WT	MLRLLVVASLVLYGHS	2
Активационный пептид PPE WT; участок расщепления трипсином выделен подчеркиванием	<u>TQDFPETNAR/VVGG</u>	3
Белок PPE WT; пептидазный домен	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCG GTLIRQNWVMTAAHCVDRELTFRVVVGEHNL NQNDGTEQYVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGY DIALLR LAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILANN PCYITGWGLTRTNGQLAQTLQQAYLPTVDYAI SSSSYWGSTVKNSMVCAGGDGVRSGCQGDS GGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSRLGCNVTRK PTVFTRVSAAYISWINNVIASN	4

В данном документе описано, что PPE способна уничтожать раковые клетки, независимо от их генетических аномалий, и относительно безвредна для нераковых или здоровых клеток. Тем не менее, одним из препятствий для противоопухолевой эффективности PPE является присутствие ингибиторов сериновых протеаз, таких как альфа-1-антитрипсин (A1AT; UniProtKB - P01009), в крови и микроокружении опухоли. В некоторых случаях A1AT связывается с PPE дикого типа и ингибирует ее каталитическую активность, тем самым нарушая активность уничтожения раковых клеток PPE дикого типа.

Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным PPE, которые обладают повышенной активностью уничтожения раковых клеток и/или уменьшенным связыванием и/или взаимодействием с человеческим белком A1AT относительно таковых у белка PPE дикого типа. В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере одно аминокислотное изменение находится в пептидазном домене PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4) по одному или более остаткам Q211, T55, D74, R75, S214, R237 и/или N241, при этом нумерация определена по SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно аминокислотное изменение представляет собой замену, делецию и/или добавление аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно аминокислотное изменение выбрано из одного или более из Q211F, T55A, D74A, R75A, R75E, Q211A, S214A, R237A, N241A и N241Y, при этом нумерация определена по SEQ ID NO: 1. Иллюстративные аминокислотные последовательности модифицированных белков PPE (активных пептидазных доменов PPE) представлены в таблице S2.

<b>Таблица S2. Последовательности модифицированного пептидазного домена PPE</b>		
<b>Название</b>	<b>Последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>Мутант F</b>	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVMTAAHCVDRELTFRVVVGEHNLNQNNDGTEQ	<b>5</b>

Q211F	YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGC <u>F</u> GDSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	
Мутант H T55A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAH <u>A</u> CGGTLIR QNWVMTAAHCVDRELTFR VVVGEHNLNQNNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	6
Мутант A N241A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVMTAAHCVDRELTFR VVVGEHNLNQNNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGC <u>A</u> VTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	7
Мутант B N241Y	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVMTAAHCVDRELTFR VVVGEHNLNQNNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGC <u>Y</u> VTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	8
Мутант C R75A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVMTAAHCVD <u>A</u> ELTFR VVVGEHNLNQNNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRLAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL	9

	AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNV IASN	
Мутант D R75E	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVM TAAHCVD <u>E</u> ELTFRVVVGEHNLNQNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLR LAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNV IASN	10
Мутант E Q211A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVM TAAHCVDREL TFRVVVGEHNLNQNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLR LAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGC <u>A</u> GDSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNV IASN	11
Мутант G R237A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVM TAAHCVDREL TFRVVVGEHNLNQNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLR LAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFV <u>S</u> LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNV IASN	12
Мутант I S214A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVM TAAHCVDREL TFRVVVGEHNLNQNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLR LAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGD <u>A</u> GGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR	13

	LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	
Мутант J D74A	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIR QNWVMTAAHCV <u>A</u> RELTFRVVVGEHNLNQNDGTEQ YVGVQKIVVHPYWNTDDVAAGYDIALLRQAQSVTL NSYVQLGVLPRAGTILANNSPCYITGWGLTRTNGQL AQTLQQAYLPTVDYAICSSSSYWGSTVKNSMVCAG GDGVRSGCQGDSGGPLHCLVNGQYAVHGVTSFVSR LGCNVTRKPTVFTRVSA YISWINNVIASN	14

Таким образом, в определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из **таблицы S2**, или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из **таблицы S2**, и которая сохраняет по меньшей мере одно аминокислотное изменение относительно белка PPE дикого типа. В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE из **таблицы S2** или его вариант содержит сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2), активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3) или как первый, так и второй на своем N-конце. Определенные модифицированные белки PPE находятся в ферментативно-неактивной форме пробелка (т. е. модифицированного пробелка PPE), содержащей N-концевой сигнальный пептид и активационный пептид, а также аминокислотную последовательность, выбранную из **таблицы S2**, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из **таблицы S2**, которая сохраняет по меньшей мере одно аминокислотное изменение относительно белка PPE дикого типа. В некоторых случаях модифицированный белок PPE в его неактивной форме пробелка PPE активируется в результате расщепления протеазой активационного пептида (например, в результате расщепления трипсином SEQ ID NO: 3 или в результате расщепления альтернативной протеазой в модифицированном активационном пептиде) с образованием ферментативно

активного модифицированного белка PPE. Активация может происходить в условиях *in vitro* или *in vivo*, например, в раковой ткани или в месте локализации опухоли.

Например, в определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 5 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211F, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 6 и которая сохраняет аминокислотную замену T55A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 7 и которая сохраняет аминокислотную замену N241A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3).

В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 8 и которая сохраняет аминокислотную замену N241Y, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный

пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 9 и которая сохраняет аминокислотную замену R75A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 10 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 10 и которая сохраняет аминокислотную замену R75E, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 11 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 11 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3).

В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 12 и которая сохраняет аминокислотную замену R237A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной

последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 13 и которая сохраняет аминокислотную замену S214A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ. ID NO: 14 и которая сохраняет аминокислотную замену D74A, и при этом в некоторых случаях он находится в форме пробелка (модифицированного пробелка PPE), который содержит N-концевой сигнальный пептид (например, SEQ ID NO: 2) и активационный пептид (например, SEQ ID NO: 3).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок или пробелок PPE содержит модифицированный активационный пептид относительно последовательности активационного пептида дикого типа SEQ ID NO: 3. В данных и связанных с ними вариантах осуществления модифицированный активационный пептид содержит гетерологичный участок расщепления протеазой, который не расщепляется трипсином (как активационный пептид дикого типа), но вместо этого расщепляется протеазой, выбранной из металлопротеазы, аспартилпротеазы и цистеиновой протеазы. Включение таких нетрипсиновых гетерологичных участков расщепления протеазой можно применять, например, для улучшения или иного облегчения селективного расщепления и активации модифицированного пробелка PPE в раковой ткани или в месте локализации опухоли *in vivo* относительно других систем активации трипсиновыми протеазами с участием активационного пептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный участок расщепления протеазой может расщепляться протеазой, выбранной из MMP12, катепсина D (CTSD), катепсина C (CTSC) и катепсина L (CTSL). Конкретные примеры гетерологичных участков расщепления протеазой включают участки расщепления MMP12, такие как GAAG/LGGA (SEQ ID NO: 15), GAAG/VVGG (SEQ ID NO: 16) и GAAG/LVGG (SEQ ID NO: 17); участки расщепления CTSD, такие как LLVL/VVLG (SEQ ID NO: 18) и LLVL/VVGG (SEQ ID NO: 19); участки

расщепления CTSC, такие как ASEI/VGGR (SEQ ID NO: 20); и участки расщепления CTSL, такие как ALLG/AAGG (SEQ ID NO: 21), ALLG/VVGG (SEQ ID NO: 22) и ALLG/AVGG (SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток относительно таковой у белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в отсутствие человеческого белка A1AT *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток в отсутствие человеческого белка A1AT, которая приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз или больше превышает активность уничтожения раковых клеток белка PPE дикого типа. В определенных вариантах осуществления повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в присутствии человеческого белка A1AT в условиях *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный белок PPE обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток в присутствии человеческого белка A1AT, которая в приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность уничтожения раковых клеток белка PPE дикого типа.

В определенных вариантах осуществления модифицированный белок PPE характеризуется пониженным связыванием и/или взаимодействием с человеческим белком A1AT относительно белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления модифицированная PPE характеризуется пониженным связыванием с человеческим A1AT, которое в приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше ниже связывания белка PPE дикого типа с человеческим белком A1AT. Связывание можно измерить *in vivo* или *in vitro*.

В определенных вариантах осуществления модифицированная PPE обладает активностью сериновой протеазы, например, где модифицированная PPE обладает такой же или практически такой же активностью сериновой протеазы, что и PPE

дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления модифицированная PPE обладает приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000% или больше активности сериновой протеазы у PPE дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированная PPE обладает повышенной активностью сериновой протеазы относительно PPE дикого типа, например, при измерении в присутствии или в отсутствие человеческого белка A1AT. В некоторых вариантах осуществления активность сериновой протеазы у модифицированной PPE в присутствии человеческого белка A1AT (например, *in vivo*, *in vitro*) в приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или выше, чем активность сериновой протеазы у PPE дикого типа в тех же или сопоставимых условиях. В некоторых вариантах осуществления активность сериновой протеазы у модифицированной PPE в отсутствие человеческого белка A1AT (например, *in vivo*, *in vitro*) в приблизительно или в по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или выше, чем активность сериновой протеазы у PPE дикого типа в тех же или сопоставимых условиях.

Активность сериновой протеазы и активность уничтожения раковых клеток можно измерить в соответствии со стандартными методиками, известными из уровня техники. Например, активность сериновой протеазы можно отслеживать с помощью колориметрического анализа активности субстрата (N-метоксисукцинил-Ala-Ala-Pro-Val-p-нитроанилида), а цитолитическую активность в отношении раковых клеток можно измерять в условиях *in vitro* или *in vivo*.

### **Способы применения и фармацевтические композиции**

Определенные варианты осуществления предусматривают способы лечения, облегчения симптомов и/или замедления прогрессирования заболевания или патологического состояния у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту композиции, содержащей по меньшей мере один модифицированный белок или пробелок PPE, который описан в данном документе. В отдельных вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, то есть нуждающийся в этом субъект имеет, подозревается в наличии или имеет риск

развития рака. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит модифицированный пробелок PPE (неактивную форму), который активируется в результате расщепления активационного пептида в раковой ткани или месте локализации опухоли нуждающегося в этом субъекта с образованием активного модифицированного белка PPE.

В отдельных вариантах осуществления рак представляет собой первичный рак или метастатический рак. В конкретных вариантах осуществления рак выбран из одного или более из меланомы (необязательно метастатической меланомы), рака молочной железы (необязательно трижды негативного рака молочной железы, TNBC), рака почки (необязательно почечно-клеточной карциномы), рака поджелудочной железы, рака кости, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мезотелиомы, лейкоза (необязательно лимфолейкоза, хронического миелогенного лейкоза, острого миелоидного лейкоза или рецидивирующего острого миелоидного лейкоза), множественной миеломы, лимфомы, гепатомы (гепатоклеточной карциномы), саркомы, В-клеточного злокачественного новообразования, рака яичников, колоректального рака, глиомы, мультиформной глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, первичной лимфомы ЦНС, примитивной нейроэктодермальной опухоли (медуллобластомы), рака мочевого пузыря, рака матки, рака пищевода, рака головного мозга, различных форм рака головы и шеи, рака шейки матки, рака яичка, рака щитовидной железы и рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления, как отмечалось выше, рак представляет собой метастатический рак. В дополнение к вышеупомянутым видам рака иллюстративные метастатические виды рака включают без ограничения различные формы рака мочевого пузыря с метастазами в кость, печень и/или легкие; различные формы рака молочной железы с метастазами в кость, головной мозг, печень и/или легкие; различные формы колоректального рака с метастазами в печень, легкие и/или брюшину; различные формы рака почки с метастазами в надпочечники, кость, головной мозг, печень и/или легкие; различные формы рака легкого с метастазами в надпочечники, кость, головной мозг, печень и/или другие

участки легкого; различные формы меланомы с метастазами в кость, головной мозг, печень, легкое и/или кожу/мышцу; различные формы рака яичника с метастазами в печень, легкое и/или брюшину; различные формы рака поджелудочной железы с метастазами в печень, легкое и/или брюшину; различные формы рака предстательной железы с метастазами в надпочечники, кость, печень и/или легкие; различные формы рака желудка с метастазами в печень, легкое и/или брюшину; различные формы рака щитовидной железы с метастазами в кость, печень и/или легкие и различные формы рака матки с метастазами в кость, печень, легкое, брюшину и/или влагалище; помимо прочих.

Способы лечения различных видов рака можно комбинировать с другими терапевтическими способами. Например, комбинированную терапию, описанную в данном документе, можно применять в отношении субъекта до, во время или после других терапевтических вмешательств, в том числе симптоматического лечения, лучевой терапии, хирургического вмешательства, трансплантации, гормональной терапии, фотодинамической терапии, терапии антибиотиками или любой их комбинации. Симптоматическая терапия предусматривает введение кортикостероидов для уменьшения отека мозга, головных болей, когнитивной дисфункции и рвоты, а также введение противосудорожных средств для уменьшения судорог. Лучевая терапия предусматривает облучение всего головного мозга, фракционную лучевую терапию и радиохимию, такую как стереотаксическая радиохимию, которую можно дополнительно комбинировать с традиционной хирургией.

Таким образом, определенные варианты осуществления включают варианты комбинированной терапии для лечения видов рака, в том числе способы лечения, направленные на облегчение симптомов или ингибирование прогрессирования рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту модифицированного белка или пробелка PPP, описанного в данном документе, в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным средством, например, иммунотерапевтическим средством, химиотерапевтическим средством, гормональным терапевтическим средством и/или ингибитором киназы. В некоторых вариантах осуществления введение модифицированного белка или

пробелка PPE повышает восприимчивость рака к дополнительному средству (например, иммунотерапевтическому средству, химиотерапевтическому средству, гормональному терапевтическому средству и/или ингибитору киназы) на приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000% или больше относительно только дополнительного средства.

В определенных вариантах комбинированной терапии применяют одно или более противораковых иммунотерапевтических средств или «иммунотерапевтических средств». В определенных случаях иммунотерапевтическое средство модулирует иммунный ответ субъекта, например, для повышения или поддержания связанного с раком или специфичного для рака иммунного ответа и, таким образом, приводит к повышенному ингибированию или уменьшению иммунными клетками количества раковых клеток. Иллюстративные иммунотерапевтические средства включают полипептиды, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, лиганды и небольшие пептиды, а также их смеси. Также в качестве иммунотерапевтических средств включены малые молекулы, клетки (например, иммунные клетки, такие как Т-клетки), различные противораковые вакцины, средства генной терапии или другие средства на основе полинуклеотидов, в том числе вирусные средства, такие как онколитические вирусы, и другие, известные в уровне техники. Таким образом, в определенных вариантах осуществления противораковое иммунотерапевтическое средство выбрано из одного или более средств, модулирующих иммунные контрольные точки, противораковых вакцин, онколитических вирусов, цитокинов и клеточных средств иммунотерапии.

В определенных вариантах осуществления противораковое иммунотерапевтическое средство представляет собой средство, модулирующее иммунные контрольные точки. Отдельные примеры включают «антагонисты» одной или более ингибирующих молекул иммунных контрольных точек и «агонисты» одной или более стимулирующих молекул иммунных контрольных точек. Как правило, молекулы иммунных контрольных точек представляют собой компоненты иммунной системы, которые либо усиливают сигнал (костимулирующие молекулы), либо подавляют сигнал, целенаправленное

воздействие на которые обладает терапевтическим потенциалом при раке, поскольку раковые клетки могут нарушать естественную функцию молекул иммунных контрольных точек (см., например, Sharma and Allison, *Science*. 348:56-61, 2015; Topalian et al., *Cancer Cell*. 27:450-461, 2015; Pardoll, *Nature Reviews Cancer*. 12:252-264, 2012). В некоторых вариантах осуществления средство, модулирующее иммунные контрольные точки (например, антагонист, агонист), «связывается» или «специфически связывается» с одной или более молекулами иммунных контрольных точек, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления средство, модулирующее иммунные контрольные точки, представляет собой антагонист или ингибитор одной или более ингибирующих молекул иммунных контрольных точек. К иллюстративным ингибирующим молекулам иммунных контрольных точек относятся лиганд 1 запрограммированной смерти (PD-L1), лиганд 2 запрограммированной смерти (PD-L2), белок 1 запрограммированной смерти (PD-1), V-доменный иммуноглобулиновый супрессор активации Т-клеток (VISTA), ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4 (CTLA-4), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO), Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен 3 муцина (TIM-3), ген 3 активации лимфоцитов (LAG-3), аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), CD160 и Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT).

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор (рецептора) PD-1, целенаправленное воздействие на который, как было показано, восстанавливает иммунную функцию в окружении опухоли (см., например, Phillips et al., *Int Immunol*. 27:39-46, 2015). PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на Т-клетках и про-В-клетках. PD-1 взаимодействует с двумя лигандами: PD-L1 и PD-L2. PD-1 функционирует как ингибирующая молекула иммунных контрольных точек, например, путем снижения или предупреждения активации Т-клеток, что, в свою очередь, снижает аутоиммунитет и стимулирует толерантность к «своему». Ингибирующий эффект в отношении PD-1 достигается, по меньшей мере частично, за счет двойного

механизма стимуляции апоптоза в антигенспецифических Т-клетках в лимфатических узлах, а также снижения степени проявления апоптоза в регуляторных Т-клетках (супрессорных Т-клетках). Некоторые примеры антагонистов или ингибиторов PD-1 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с PD-1 и снижают одну или более его иммуносупрессивных активностей, например, его последующую передачу сигналов или его взаимодействие с PD-L1. Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов PD-1 включают антитела ниволумаб, пембролизумаб, PDR001, МК-3475, AMP-224, AMP-514 и пидилизумаб, а также их антигенсвязывающие фрагменты (см., например, патенты США №№ 8008449, 8993731, 9073994, 9084776, 9102727, 9102728, 9181342, 9217034, 9387247, 9492539, 9492540 и заявки на патенты США №№ 2012/0039906, 2015/0203579).

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор PD-L1. Как отмечалось выше, PD-L1 является одним из природных лигандов рецептора PD-1. Общие примеры антагонистов или ингибиторов PD-L1 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с PD-L1 и снижают одну или более его иммуносупрессивных активностей, например, его связывание с рецептором PD-1. Конкретные примеры антагонистов PD-L1 включают антитела атезолизумаб (MPDL3280A), авелумаб (MSB0010718C) и дурвалумаб (MEDI4736), а также их антигенсвязывающие фрагменты (см., например, патенты США №№ 9102725, 9393301, 9402899, 9439962).

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор PD-L2. Как отмечалось выше, PD-L2 является одним из природных лигандов рецептора PD-1. Общие примеры антагонистов или ингибиторов PD-L2 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с PD-L2 и снижают одну или более его иммуносупрессивных активностей, например, его связывание с рецептором PD-1.

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор VISTA. VISTA имеет размер примерно 50 кДа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (имеет один домен IgV) и семейству B7. Он в

основном экспрессируется в лейкоцитах, и его транскрипция частично контролируется посредством p53. Существуют данные о том, что VISTA может выполнять роль как лиганда, так и рецептора на Т-клетках для ингибирования эффекторной функции Т-клеток и поддержания периферической толерантности. VISTA продуцируется в больших количествах в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, таких как супрессорные клетки миелоидного происхождения и регуляторные Т-клетки, а его блокада антителом приводит к задержке роста опухоли в мышинных моделях меланомы и плоскоклеточной карциномы. К иллюстративным антагонистическим антителам к VISTA относятся, например, антитела, описанные в WO 2018/237287, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор CTLA-4. CTLA4 или CTLA-4 (ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксический белок 4), также известный как CD152 (кластер дифференцировки 152), представляет собой белковый рецептор, который функционирует как ингибирующая молекула иммунных контрольных точек, например, путем передачи ингибирующих сигналов Т-клеткам при их связывании с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Общие примеры антагонистов или ингибиторов CTLA-4 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с CTLA-4. Отдельные примеры включают антитела ипилимумаб и тремелиумаб и их антигенсвязывающие фрагменты. Считается, что по меньшей мере часть активности ипилимумаба опосредована антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), подвергающей цитолизу супрессорные Treg-клетки, которые экспрессируют CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор IDO либо антагонист или ингибитор TDO. IDO и TDO представляют собой катаболизирующие триптофан ферменты с иммуноингибирующими свойствами. Например, известно, что IDO супрессирует Т-клетки и NK-клетки, запускает образование и активирует Treg-клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения и стимулирует ангиогенез

опухоли. Общие примеры антагонистов или ингибиторов IDO и TDO включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с IDO или TDO (см., например, Platten et al., *Front Immunol.* 5: 673, 2014) и снижают или ингибируют одну или более иммуносупрессивных активностей. Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов IDO включают индоксимод (NLG-8189), 1-метилтриптофан (1MT),  $\beta$ -карболин (норхарман; 9H-пиридо[3,4-b]индол), розмариновую кислоту и эпикадостат (см., например, Sheridan, *Nature Biotechnology.* 33:321-322, 2015). Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов TDO включают 680C91 и LM10 (см., например, Pilotte et al., *PNAS USA.* 109:2497-2502, 2012).

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор TIM-3. Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен 3 муцина (TIM-3) экспрессируется на активированных человеческих CD4<sup>+</sup> Т-клетках и регулирует цитокины Th1 и Th17. TIM-3 также выполняет роль отрицательного регулятора функции Th1/Tc1, запуская гибель клеток при взаимодействии со своим лигандом, галектином-9. TIM-3 вносит вклад в супрессивное микроокружение опухоли, а его сверхэкспрессия связана с плохим прогнозом при различных формах рака (см., например, Li et al., *Acta Oncol.* 54:1706-13, 2015). Общие примеры антагонистов или ингибиторов TIM-3 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с TIM-3 и снижают или ингибируют одну или более его иммуносупрессивных активностей.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор LAG-3. Ген 3 активации лимфоцитов (LAG-3) экспрессируется на активированных Т-клетках, натуральных киллерных клетках, В-клетках и плазматоидных дендритных клетках. Он отрицательно регулирует клеточную пролиферацию, активацию и гомеостаз Т-клеток, аналогично CTLA-4 и PD-1 (см., например, Workman and Vignali. *European Journal of Immun.* 33: 970-9, 2003; и Workman et al., *Journal of Immun.* 172: 5450-5, 2004), и, как сообщается, играет роль в супрессирующей функции Treg-клеток (см., например, Huang et al., *Immunity.* 21: 503-13, 2004). LAG3 также поддерживает CD8<sup>+</sup> Т-клетки в толерогенном

состоянии и оказывает сочетанное с PD-1 действие для поддержания истощения количества CD8 Т-клеток. Общие примеры антагонистов или ингибиторов LAG-3 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с LAG-3 и ингибируют одну или более его иммуносупрессивных активностей. Конкретные примеры включают антитело BMS-986016 и его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор BTLA. Экспрессия аттенуатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA; CD272) индуцируется во время активации Т-клеток, и он ингибирует Т-клетки посредством взаимодействия с рецепторами семейства факторов некроза опухоли (TNF-R) и рецепторами клеточной поверхности семейства B7. BTLA является лигандом для представителя 14 суперсемейства (рецепторов) факторов некроза опухоли (TNFRSF14), также известного как медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM). Комплексы BTLA-HVEM отрицательно регулируют Т-клеточные иммунные ответы, например, путем ингибирования функции человеческих CD8+ онкоспецифических Т-клеток (см., например, Derré et al., J Clin Invest 120:157–67, 2009). Общие примеры антагонистов или ингибиторов BTLA включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с BTLA-4 и снижают одну или более его иммуносупрессивных активностей.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор HVEM, например, антагонист или ингибитор, который специфически связывается с HVEM и препятствует его взаимодействию с BTLA или CD160. Общие примеры антагонистов или ингибиторов HVEM включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с HVEM, необязательно снижают степень взаимодействия HVEM/BTLA и/или HVEM/CD160 и тем самым снижают одну или более иммуносупрессивных активностей HVEM.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор CD160, например, антагонист или ингибитор, который специфически связывается с CD160 и препятствует его взаимодействию с HVEM.

Общие примеры антагонистов или ингибиторов CD160 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с CD160, необязательно снижают взаимодействие CD160/HVEM и тем самым снижают или ингибируют одну или более его иммуносупрессивных активностей.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антагонист или ингибитор TIGIT. Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) представляет собой коингибирующий рецептор, который находится на поверхности ряда лимфоидных клеток и супрессирует противоопухолевый иммунитет, например, посредством Treg-клеток (Kurtulus et al., *J Clin Invest.* 125:4053-4062, 2015). Общие примеры антагонистов или ингибиторов TIGIT включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, которые специфически связываются с TIGIT и снижают одну или более его иммуносупрессивных активностей (см., например, Johnston et al., *Cancer Cell.* 26:923-37, 2014).

В определенных вариантах осуществления средство, модулирующее иммунные контрольные точки, представляет собой агонист одной или более стимулирующих молекул иммунных контрольных точек. К иллюстративным стимулирующим молекулам иммунных контрольных точек относятся CD40, OX40, ген, относящийся к семейству глюкокортикоид-индуцированных TNFR (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, CD28, CD226 и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM).

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист CD40. CD40 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (APC) и некоторых злокачественных новообразованиях. Его лигандом является CD40L (CD154). На APC лигирование приводит к активации костимулирующих молекул, потенциальному обходу потребности в помощи Т-клеток при противоопухолевом иммунном ответе. Терапия агонистами CD40 играет важную роль в созревании APC и их миграции из опухоли в лимфатические узлы, что приводит к повышенной презентации антигена и активации Т-клеток. Агонистические антитела к CD40 вызывают существенные ответы и стойкий противораковый иммунитет на животных моделях, эффект, по меньшей мере частично опосредованный

цитотоксическими Т-клетками (см., например, Johnson et al. Clin Cancer Res. 21: 1321-1328, 2015; и Vonderheide and Glennie, Clin Cancer Res. 19:1035-43, 2013). Общие примеры агонистов CD40 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с CD40 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают CP-870893, дацетузумаб, Chi Lob 7/4, ADC-1013, CD40L, rhCD40L и их антигенсвязывающие фрагменты. Конкретные примеры агонистов CD40 включают без ограничения APX005 (см., например, US 2012/0301488) и APX005M (см., например, US 2014/0120103).

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист OX40. OX40 (CD134) стимулирует размножение эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти и супрессирует дифференцировку и активность Т-регуляторных клеток (см., например, Croft et al., Immunol Rev. 229:173–91, 2009). Его лигандом является OX40L (CD252). Поскольку передача сигналов с участием OX40 влияет как на активацию, так и на выживание Т-клеток, она играет ключевую роль в инициации противоопухолевого иммунного ответа в лимфатическом узле и в поддержании противоопухолевого иммунного ответа в микроокружении опухоли. Общие примеры агонистов OX40 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с OX40 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают OX86, OX-40L, Fc-OX40L, GSK3174998, MEDI0562 (гуманизированный агонист OX40), MEDI6469 (мышинный агонист OX4) и MEDI6383 (агонист OX40), а также их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист GITR. Ген, относящийся к семейству глюкокортикоид-индуцированных TNFR (GITR), повышает уровень размножения Т-клеток, ингибирует супрессивную активность Treg-клеток и продлевает выживание Т-эффекторных клеток. Было показано, что агонисты GITR стимулируют противоопухолевый ответ за счет потери стабильности линии дифференцировки Treg (см., например, Schaer et al., Cancer Immunol Res. 1:320–31, 2013). Такие разнообразные механизмы свидетельствуют, что GITR играет важную роль в инициации иммунного ответа в лимфатических

узлах и в поддержании иммунного ответа в опухолевой ткани. Его лигандом является GITRL. Общие примеры агонистов GITR включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с GITR и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают GITRL, INCAGN01876, DTA-1, MEDI1873 и их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист CD137. CD137 (4-1BB) является представителем семейства рецепторов факторов некроза опухоли (TNF), и перекрестное связывание CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Опосредованная CD137 передача сигналов также защищает Т-клетки, такие как CD8<sup>+</sup> Т-клетки, от индуцируемой посредством активации гибели клеток. Общие примеры агонистов CD137 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с CD137 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают лиганд CD137 (или 4-1BB) (см., например, Shao and Schwarz, *J Leukoc Biol.* 89:21-9, 2011) и антитело утомилумаб, в том числе его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист CD27. Стимуляция CD27 повышает уровень антиген-специфического размножения наивных Т-клеток и вносит вклад в Т-клеточную память и долгосрочное поддержание Т-клеточного иммунитета. Его лигандом является CD70. Нацеливание агонистического антитела на человеческий CD27 стимулирует активацию Т-клеток и противоопухолевый иммунитет (см., например, Thomas et al., *Oncoimmunology.* 2014;3:e27255. doi:10.4161/onci.27255; и He et al., *J Immunol.* 191:4174-83, 2013). Общие примеры агонистов CD27 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с CD27 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают CD70 и антитела варлилумаб и CDX-1127 (1F5), в том числе их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист CD28. CD28 конститутивно экспрессируется CD4<sup>+</sup> Т-клетками, некоторыми CD8<sup>+</sup> Т-клетками. К его лигандам относятся CD80 и CD86, а его стимуляция повышает уровень размножения Т-клеток. Общие примеры агонистов CD28 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с CD28 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей. Конкретные примеры включают CD80, CD86, антитело TAV08 и его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист CD226. CD226 представляет собой стимулирующий рецептор, который имеет общие лиганды с TIGIT, и, в противоположность TIGIT, активация CD226 усиливает активацию Т-клеток (см., например, Kurtulus et al., *J Clin Invest.* 125:4053-4062, 2015; Bottino et al., *J Exp Med.* 1984:557-567, 2003; и Tahara-Hanaoka et al., *Int Immunol.* 16:533-538, 2004). Общие примеры агонистов CD226 включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд (например, CD112, CD155), которые специфически связываются с CD226 и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой агонист HVEM. Медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), также известный как представитель 14 суперсемейства рецепторов факторов некроза опухоли (TNFRSF14), представляет собой человеческий рецептор клеточной поверхности из суперсемейства TNF-рецепторов. HVEM обнаруживается на ряде клеток, в том числе Т-клетках, APC и других иммунных клетках. В отличие от других рецепторов, HVEM характеризуется высокими уровнями экспрессии на покоящихся Т-клетках и его экспрессия подавляется при их активации. Было показано, что передача сигналов с участием HVEM играет решающую роль на ранних фазах активации Т-клеток и во время размножения популяций опухолеспецифических лимфоцитов в лимфатических узлах. Общие примеры агонистов HVEM включают антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или малую молекулу, или лиганд, которые специфически связываются с HVEM и повышают одну или более его иммуностимулирующих активностей.

В определенных вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело. Например, некоторые биспецифические или полиспецифические антитела способны (i) связываться и ингибировать одну или более ингибирующих молекул иммунных контрольных точек, а также (ii) связываться с одной или более стимулирующими молекулами иммунных контрольных точек и оказывать на них агонистическое действие. В определенных вариантах осуществления биспецифическое или полиспецифическое антитело (i) связывается с одним или более из PD-L1, PD-L2, PD-1, CTLA-4, IDO, TDO, TIM-3, LAG-3, BTLA, CD160 и/или TIGIT и ингибирует их, а также (ii) связывается с одним или более из CD40, OX40, гена, относящегося к семейству глюкокортикоид-индуцированных TNFR (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, CD28, CD226 и/или посредника проникновения вируса герпеса (HVEM) и оказывает на них агонистическое действие.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство представляет собой противораковую вакцину. В определенных вариантах осуществления противораковая вакцина выбрана из одного или более из Oncophage, вакцины против человеческого вируса папилломы HPV, необязательно Gardasil или Cervarix, вакцины против вируса гепатита В, необязательно Engerix-B, Recombivax HB или Twinrix, и sipuleucel-T (Provenge), или содержит раковый антиген, выбранный из одного или более из человеческого Her2/neu, рецептора Her1/EGF (EGFR), Her3, антигена A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (рецептора IgE), MAGE-3, антигена C242, 5T4, IL-6, IL-13, фактора роста эндотелия сосудов VEGF (например, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, тенаксина, виментина, рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), альфа-фетопротейна, инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1), карбоангидразы 9 (CA-IX), карциноэмбрионального антигена (CEA), гуанилилциклазы C, NY-ESO-1, p53, сурвивина, интегрин  $\alpha\upsilon\beta3$ , интегрин  $\alpha5\beta1$ , фолатного рецептора 1, трансмембранного гликопротеина NMB, белка активации фибробластов альфа (FAP), гликопротеина 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (или CA-125), фосфатидилсерина, простатспецифического мембранного антигена (PMSA), антигена NR-LU-13, TRAIL-R1, представителя 10b суперсемейства рецепторов

факторов некроза опухоли (TNFRSF10B или TRAIL-R2), представителя 7 семейства SLAM (SLAMF7), антигена панкарциномы EGP40, фактора активации В-клеток (BAFF), рецептора тромбоцитарного фактора роста, гликопротеина ЕpCAM (17-1A), белка-1 запрограммированной смерти, протеиндисульфидизомеразы (PDI), фосфатазы 3 регенерирующей печени (PRL-3), фосфатазы простатической кислоты, антигена Льюиса-Y, GD2 (дисialogанглиозида, экспрессируемого на опухолях нейроэктодермального происхождения), глипикана-3 (GPC3) и мезотелина.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство представляет собой онколитические вирусы. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус выбран из одного или более из Talimogene laherparepvec (T-VEC), вируса Коксаки A21 (CAVATAK™), онкорина (H101), пелареорепа (REOLYSIN®), вируса долины Сенека (NTX-010), *Senecavirus* SVV-001, ColoAd1, SEPRENVIR (HSV-1716), CGTG-102 (Ad5/3-D24-GMCSF), GL-ONC1, MV-NIS и DNX-2401.

В определенных вариантах осуществления противораковое иммунотерапевтическое средство представляет собой цитокин. К иллюстративным цитокинам относятся интерферон (IFN)- $\alpha$ , IL-2, IL-12, IL-7, IL-21 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

В определенных вариантах осуществления противораковое иммунотерапевтическое средство представляет собой клеточное средство иммунотерапии, например, средство терапии, в котором используют иммунные клетки, в том числе иммунные клетки, полученные в условиях *ex vivo*, такие как лимфоциты, натуральные киллерные клетки (NK-клетки), макрофаги и/или дендритные клетки (DC). В некоторых вариантах осуществления к лимфоцитам относятся Т-клетки, например, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). См., например, June, *J Clin Invest.* 117: 1466-1476, 2007; Rosenberg and Restifo, *Science.* 348:62-68, 2015; Cooley et al., *Biol. of Blood and Marrow Transplant.* 13:33-42, 2007; и Li and Sun, *Chin J Cancer Res.* 30:173-196, 2018, для описания средств иммунотерапии на основе адоптивных Т-клеток и NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки включают специфические к раковому антигену Т-клетки, которые направлены против по меньшей мере одного ракового антигена.

В некоторых вариантах осуществления специфические к раковому антигену Т-клетки выбраны из одной или более из Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), Т-клеток, модифицированных Т-клеточным рецептором (TCR), противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (TIL) и пептид-индуцируемых Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления CAR-модифицированная Т-клетка нацелена на CD-19 (см., например, Maude et al., Blood. 125:4017-4023, 2015). В некоторых случаях полученные в условиях *ex vivo* иммунные клетки представляют собой аутологичные клетки, которые получены от подлежащего лечению пациента.

В определенных средствах комбинированной терапии применяют одно или более химиотерапевтических средств, например, низкомолекулярных химиотерапевтических средств. Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают, помимо прочих, алкилирующие средства, антиметаболиты, цитотоксические антибиотики, ингибиторы топоизомеразы (типа I или типа II) и средства против микротрубочек.

Примеры алкилирующих средств включают азотистые иприты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, мустин, мелфалан, хлорамбуцил, ифосфамид и бусульфан), нитрозомочевины (например, N-нитрозо-N-метилмочевину (MNU), кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (MeCCNU), фотемустин и стрептозотоцин), тетразины (например, дакарбазин, митозоломид и темозоломид), азиридины (например, тиотепу, митомицин и диазиквон (AZQ)), цисплатины и их производные (например, карбоплатин и оксалиплатин) и неклассические алкилирующие средства (необязательно прокарбазин и гексаметилмеламин).

Примеры антиметаболитов включают антифолаты (например, метотрексат и пеметрексед), фторпиримидины (например, 5-фторурацил и капецитабин), аналоги дезоксинуклеозидов (например, анцитабин, эноцитабин, цитарабин, гемцитабин, децитабин, азациитидин, флударабин, неларабин, кладрибин, клофарабин, флударабин и пентостатин) и тиопурины (например, тиогуанин и меркаптопурин).

Примеры цитотоксических антибиотиков включают антрациклины (например, доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин, идарубицин, пирарубицин,

акларубицин и митоксантрон), блеомицины, митомицин С, митоксантрон и актиномицин. Примеры ингибиторов топоизомеразы включают камптотецин, иринотекан, топотекан, этопозид, доксорубицин, митоксантрон, тенипозид, новобиоцин, мербарон и акларубицин.

Примеры средств против микротрубочек включают таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел) и алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин).

Различные химиотерапевтические средства, описанные в данном документе, можно комбинировать с любым одним или более из описанных в данном документе модифицированных белков или пробелков РРЕ и применять в соответствии с любым одним или более из описанных в данном документе способов или композиций.

В определенных средствах комбинированной терапии применяют по меньшей мере одно гормональное терапевтическое средство. Общие примеры гормональных терапевтических средств включают гормональные агонисты и гормональные антагонисты. Отдельные примеры гормональных агонистов включают прогестоген (прогестин), кортикостероиды (например, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон), инсулиноподобные факторы роста, производные VEGF ангиогенные и лимфангиогенные факторы (например, VEGF-A, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-C, VEGF-D, PlGF-2), фактор роста фибробластов (FGF), галектин, фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF)-бета, андрогены, эстрогены и соматостатиновые аналоги. Примеры гормональных антагонистов включают ингибиторы синтеза гормонов, такие как ингибиторы ароматазы и агонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) (например, лейпролид, гозерелин, трипторелин, гистрелин), в том числе их аналоги. Также предусмотрены антагонисты гормональных рецепторов, такие как селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM; например, тамоксифен, ралоксифен, торемифен) и антиандрогены (например, флутамид, бикалутамид, нилутамид).

Также предусмотрены ингибиторы гормонального пути, такие как антитела к гормональным рецепторам. Примеры включают ингибиторы рецептора IGF (например, IGF-IR1), такие как циксутумумаб, далотузумаб, фигитумумаб, ганитумаб, истиратумаб и робатумумаб; ингибиторы рецепторов 1, 2 или 3 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1, VEGFR2 или VEGFR3), такие как алацизумаб пегол, бевацизумаб, икрукумаб, рамуцирумаб; ингибиторы TGF-бета-рецепторов R1, R2 и R3, такие как фрезолимумаб и метелимумаб; ингибиторы c-Met, такие как накситамаб; ингибиторы рецептора EGF, такие как цетуксимаб, депатуксизумаб мафодотин, футуксимаб, имгатузумаб, лапритуксимаб эмтанзин, матузумаб, модотуксимаб, нецитумумаб, нимотузумаб, панитумумаб, томузотуксимаб и залутумумаб; ингибиторы рецептора FGF, такие как апрутумаб иксадотин и бемаритузумаб; и ингибиторы рецептора PDGF, такие как оларатумаб и товетумаб.

Различные гормональные терапевтические средства, описанные в данном документе, можно комбинировать с любым одним или более из описанных в данном документе модифицированных белков или пробелков PPE и применять в соответствии с любым одним или более из описанных в данном документе способов или композиций.

В определенных вариантах комбинированной терапии применяют по меньшей мере один ингибитор киназы, в том числе ингибиторы тирозинкиназы. Примеры ингибиторов киназы включают без ограничения адавосертиб, афанитиб, афлиберцепт, акситиниб, бевацизумаб, бозутиниб, кабозантиниб, цетуксимаб, кобиметиниб, кризотиниб, дазатиниб, энтректиниб, эрдафитиниб, эрлотиниб, фостамитиниб, гефитиниб, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, мубритиниб, нилотиниб, панитумумаб, пазопаниб, пегаптаниб, понатиниб, ранибизумаб, регорафениб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656, тофацитиниб, трастузумаб, вандетаниб и вемуафениб.

Различные ингибиторы киназы, описанные в данном документе, можно комбинировать с любым одним или более из описанных в данном документе модифицированных белков или пробелков PPE и применять в соответствии с любым одним или более из описанных в данном документе способов или композиций.

В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, повышают уничтожение раковых клеток у субъекта в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше относительно контроля или эталона. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, увеличивают медианное время выживания субъекта на 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 15 недель, 20 недель, 25 недель, 30 недель, 40 недель или дольше. В определенных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, увеличивают медианное время выживания субъекта на 1 год, 2 года, 3 года или дольше. В некоторых вариантах осуществления способы и фармацевтические композиции увеличивают выживаемость без прогрессирования на 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или дольше. В определенных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, увеличивают выживаемость без прогрессирования на 1 год, 2 года, 3 года или дольше.

В определенных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, достаточны для того, чтобы результатом была регрессия опухоли, например, на что указывает статистически значимое уменьшение величины жизнеспособной опухоли, например уменьшение на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или больше опухолевой массы, или измененные (например, уменьшенные со статистической значимостью) размеры при сканировании. В определенных вариантах осуществления способов и композиций, описанных в данном документе, достаточно для того, чтобы результатом было стабильное заболевание. В определенных вариантах осуществления способов и композиций, описанных в данном документе, достаточно для того, чтобы результатом было клинически значимое уменьшение симптомов конкретного признака заболевания, известного квалифицированному врачу.

Для применения в условиях *in vivo*, как отмечалось выше, для лечения заболевания человека или отличного от человека млекопитающего или тестирования модифицированные белки или пробелки PPE, описанные в данном документе,

обычно включают в одну или более терапевтических или фармацевтических композиций перед введением, в том числе в ветеринарные терапевтические композиции.

Таким образом, определенные варианты осуществления относятся к фармацевтическим или терапевтическим композициям, которые содержат модифицированный белок или пробелок PPE, который описан в данном документе. В некоторых случаях фармацевтическая или терапевтическая композиция содержит один или более модифицированных белков или пробелков PPE, описанных в данном документе, в комбинации с фармацевтически или физиологически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. Определенные фармацевтические или терапевтические композиции дополнительно содержат по меньшей мере одно дополнительное средство, например, иммунотерапевтическое средство, химиотерапевтическое средство, гормональное терапевтическое средство и/или ингибитор киназы, которые описаны в данном документе.

Некоторые терапевтические композиции содержат (и в определенных способах применяют) лишь один модифицированный белок или пробелок PPE. Некоторые терапевтические композиции содержат (и в некоторых способах применяют) смесь по меньшей мере двух, трех, четырех или пяти различных модифицированных белков или пробелков PPE.

В отдельных вариантах осуществления фармацевтические или терапевтические композиции, содержащие модифицированный белок или пробелок PPE, являются практически чистыми в пересчете на белок или в пересчете на вес, например, композиция имеет степень чистоты по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% в пересчете на белок или в пересчете на вес.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные белки или пробелки PPE, описанные в данном документе, не образуют агрегатов, обладают требуемой растворимостью и/или имеют профиль иммуногенности, который подходит для применения на людях, как известно из уровня техники. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция, содержащая модифицированный белок или пробелок PPE, практически не содержит агрегатов.

Например, определенные композиции содержат менее приблизительно 10% (в пересчете на белок) агрегированных высокомолекулярных белков, или менее приблизительно 5% агрегированных высокомолекулярных белков, или менее приблизительно 4% агрегированных высокомолекулярных белков, или менее приблизительно 3% агрегированных высокомолекулярных белков, или менее приблизительно 2% агрегированных высокомолекулярных белков, или менее приблизительно 1% агрегированных высокомолекулярных белков. Некоторые композиции содержат модифицированный белок или пробелок PPE, который является монодисперсным на по меньшей мере приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 95% относительно его кажущейся молекулярной массы.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные белки или пробелки PPE сконцентрированы приблизительно или до по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл и составлены для различных путей биотерапевтического применения.

Для получения терапевтической или фармацевтической композиции эффективное или требуемое количество одного или более модифицированных белков или пробелков PPE смешивают с любым(-и) фармацевтическим(-и) носителем(-ями) или вспомогательным веществом, которые известны специалистам в уровне техники как подходящие для конкретного средства и/или способа введения. Фармацевтический носитель может быть жидким, полужидким или твердым. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутривенного, подкожного или местного применения, могут включать, например, стерильный разбавитель (такой как вода), солевой раствор (например, фосфатно-солевой буфер; PBS), нелетучее масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль или другой синтетический растворитель; противомикробные средства (такие как бензиловый спирт и метилпарабены); антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота и бисульфит натрия) и хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); буферы (такие как ацетаты, цитраты

и фосфаты). При внутривенном введении (например, путем IV инфузии) подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), а также растворы, содержащие загустители и солюбилизирующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их смеси.

Введение описанных в данном документе модифицированных белков или пробелков PPE в чистом виде или в соответствующей терапевтической или фармацевтической композиции можно осуществлять с помощью любого из общепринятых способов введения средств для выполнения аналогичных задач. Терапевтические или фармацевтические композиции можно получить путем объединения композиции с соответствующим физиологически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом и можно составить в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингалянты, гели, микросферы и аэрозоли. Кроме того, в композиции могут, но не обязательно, присутствовать другие фармацевтически активные ингредиенты (в том числе другие малые молекулы, которые описаны в других разделах данного документа) и/или подходящие вспомогательные вещества, такие как соли, буферы и стабилизаторы.

Введение можно осуществлять рядом различных путей, в том числе пероральным, парентеральным, назальным, внутривенным, внутрикожным, внутримышечным, подкожным или местным. Предпочтительные способы введения зависят от природы подлежащего лечению или предупреждению патологического состояния. Отдельные варианты осуществления предусматривают введение путем IV инфузии.

Носители могут включать, например, фармацевтически или физиологически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые не токсичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в используемых дозах и концентрациях. Зачастую физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с забуференным pH. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе

аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее приблизительно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 (TWEEN™), полиэтиленгликоль (PEG) и полоксамеры (PLURONIC™) и др.

В некоторых вариантах осуществления одно или более средств могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или межфазной полимеризации (например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли-(метилметацилат)микрокапсулы соответственно), в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980). Частица(-ы) или липосомы могут дополнительно содержать другие терапевтические или диагностические средства.

Точная доза и продолжительность лечения зависят от заболевания, которое лечат, и могут быть определены эмпирически с помощью известных протоколов тестирования или путем тестирования композиций в модельных системах, известных в уровне техники, и экстраполяции их результатов. Также можно провести контролируемые клинические испытания. Дозы также могут варьироваться в зависимости от степени тяжести подлежащего лечению патологического состояния. Фармацевтическую композицию обычно составляют и вводят для оказания терапевтически полезного эффекта при минимизации нежелательных побочных эффектов. Композицию можно вводить один раз или ее можно разделить на несколько меньших доз, которые необходимо вводить через определенные интервалы времени. Для каждого отдельного субъекта конкретные

режимы дозирования можно скорректировать с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями.

Таким образом, типичные пути введения данных и родственных терапевтических или фармацевтических композиций включают без ограничения пероральный, местный, трансдермальный, ингаляционный, парентеральный, подъязычный, трансбуккальный, ректальный, вагинальный и интраназальный. Используемый в данном документе термин «парентеральный» включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интратеральные инъекционные или инфузионные методики. Терапевтические или фармацевтические композиции в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения составлены таким образом, чтобы активные ингредиенты, содержащиеся в них, были биодоступными при введении композиции субъекту или пациенту. Композиции, которые будут вводить субъекту или пациенту, могут иметь форму одной или более дозированных единиц, при этом, например, таблетка может представлять собой однократную единицу дозирования, а контейнер с описанным в данном документе средством в аэрозольной форме может содержать множество дозировочных единиц. Актуальные способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области; например, см. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Подлежащая введению композиция обычно будет содержать терапевтически эффективное количество описанного в данном документе средства для лечения представляющего интерес заболевания или патологического состояния.

Терапевтическая или фармацевтическая композиция может иметь форму твердого вещества или жидкости. В некоторых вариантах осуществления носитель(-и) представляют собой частицы с тем, чтобы композиции были представлены, например, в форме таблеток или порошков. Носитель(-и) может(могут) быть жидким(-и), при этом композиции могут представлять собой, например, пероральное масло, инъекционную жидкость или аэрозоль, которые применимы, например, при ингаляционном введении. Если фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения, то она предпочтительно представлена

либо в твердой, либо в жидкой форме, при этом в формы, рассматриваемые в данном документе как твердые или жидкие, входят полутвердая, полужидкая, суспензионная и гелевая формы. Определенные варианты осуществления предусматривают стерильные инъекционные растворы.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция может быть составлена в виде порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки и др. Такая твердая композиция обычно будет содержать один или более инертных разбавителей или пищевых носителей. Кроме того, могут присутствовать одно или более из следующих веществ: связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательные вещества, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и др.; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или Sterotex; вещества, способствующие скольжению, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и красящее средство. Если фармацевтическая композиция представлена в форме капсулы, например желатиновой капсулы, то она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Терапевтическая или фармацевтическая композиция может иметь форму жидкости, например: настойки, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Как два примера, жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции. При назначении для перорального введения предпочтительная композиция содержит, помимо соединений по настоящему изобретению, один или более подсластителей, консервантов, красителей/красящих веществ и усилителей вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, можно включить одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего средства, диспергирующего средства, суспендирующего средства, буфера, стабилизатора и средства, придающего изотоничность.

Жидкие терапевтические или фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другая подобная форма, могут включать одно или более следующих вспомогательных средств: стерильные разбавители, такие как вода для инъекции, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы из стекла или пластика для многократных доз. Предпочтительным вспомогательным средством является физиологический раствор. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Жидкая терапевтическая или фармацевтическая композиция, предназначенная для парентерального или перорального введения, должна содержать такое количество средства, чтобы была получена подходящая доза. Обычно данное количество составляет по меньшей мере 0,01% представляющего интерес средства в композиции. Когда препарат предназначен для перорального введения, это количество может варьироваться от 0,1 до приблизительно 70% веса композиции. Некоторые пероральные терапевтические или фармацевтические композиции содержат от приблизительно 4% до приблизительно 75% представляющего интерес средства. В определенных вариантах осуществления терапевтические или фармацевтические композиции и препараты получают таким образом, чтобы парентеральная единица дозирования перед разведением содержала от 0,01 до 10% по весу представляющего интерес средства.

Терапевтические или фармацевтические композиции могут быть предназначены для местного применения, и в этом случае носитель предпочтительно может представлять собой раствор, эмульсию, мазь или гелевую основу. Основа,

например, может включать одно или более из следующих веществ: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, а также эмульгаторы и стабилизаторы. В терапевтической или фармацевтической композиции для местного применения могут присутствовать загустители. Если композиция предназначена для трансдермального введения, то композиция может предусматривать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза.

Терапевтические или фармацевтические композиции могут быть предназначены для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который будет таять в прямой кишке и высвобождать лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистую основу в качестве подходящего нераздражающего вспомогательного вещества. Такие основы включают без ограничения ланолин, какао-масло и полиэтиленгликоль.

Терапевтическая или фармацевтическая композиция может включать различные материалы, модифицирующие физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования. Например, композиция может включать материалы, которые образуют покрывающую оболочку вокруг активных ингредиентов. Материалы, образующие покрывающую оболочку, обычно инертны и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других энтеросолубильных покровных средств. В качестве альтернативы, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Терапевтические или фармацевтические композиции в твердой или жидкой форме могут включать компонент, который связывается со средством и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие компоненты, которые могут действовать в данном качестве, включают моноклональные или поликлональные антитела, один или более белков или липосому.

Терапевтическая или фармацевтическая композиция может фактически состоять из единиц дозирования, которые можно вводить в виде аэрозоля. Термин «аэрозоль» применяют для обозначения ряда систем, варьирующих в диапазоне от систем коллоидной природы до систем, состоящих из упаковок под давлением. Доставку можно осуществлять с помощью сжиженного или сжатого газа или подходящей

насосной системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли можно доставлять в однофазных, двухфазных или трехфазных системах для доставки активного(-ых) ингредиента(-ов). Доставка аэрозоля предусматривает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, подконтейнеры и т. п., которые вместе могут образовывать набор. Специалист в данной области без постановки излишних экспериментов сможет определить предпочтительные аэрозоли.

Описанные в данном документе композиции можно получать с носителями, которые защищают средства от быстрого выведения из организма, такими как составы или покрытия для пролонгированного высвобождения. Такие носители включают составы с контролируемым высвобождением, такие как без ограничения имплантаты и микрокапсулированные системы доставки, а также биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, сложные полиортоэфир, полимолочная кислота и другие, известные рядовым специалистам в данной области.

Терапевтические или фармацевтические композиции можно получать по методологии, хорошо известной в области фармацевтики. Например, терапевтическая или фармацевтическая композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может содержать одну или более солей, буферов и/или стабилизаторов со стерильной дистиллированной водой с целью образования раствора. Для облегчения образования гомогенных раствора или суспензии можно добавить поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют со средством с облегчением растворения или гомогенного суспензирования средства в водной системе доставки.

Терапевтические или фармацевтические композиции можно вводить в терапевтически эффективном количестве, которое будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, в том числе активности конкретного используемого соединения; метаболической стабильности и продолжительности действия соединения; возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола и рациона субъекта; способа и времени введения; скорости выведения; комбинации лекарственных средств; степени тяжести конкретного нарушения или

патологического состояния; и терапии, которую проходит субъект. В некоторых случаях терапевтически эффективная суточная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от приблизительно 0,001 мг/кг (т. е. ~0,07 мг) до приблизительно 100 мг/кг (т. е. ~7,0 г); предпочтительно терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от приблизительно 0,01 мг/кг (т. е. ~0,7 мг) до приблизительно 50 мг/кг (т. е. ~3,5 г); более предпочтительно терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от приблизительно 1 мг/кг (т. е. ~70 мг) до приблизительно 25 мг/кг (т. е. ~1,75 г). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу вводят еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективную дозу вводят еженедельно, раз в две недели или ежемесячно, например, в дозе приблизительно 1-10 или 1-5 мг/кг или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг.

Варианты комбинированной терапии, описанные в данном документе, могут предусматривать введение единого фармацевтического дозированного состава, который содержит модифицированный белок или пробелок PPE и дополнительное терапевтическое средство (например, иммунотерапевтическое средство, химиотерапевтическое средство, гормональное терапевтическое средство, ингибитор киназы), а также введение композиций, содержащих модифицированный белок или пробелок PPE, и дополнительного терапевтического средства в своем собственном отдельном фармацевтическом дозированном составе. Например, модифицированный белок или пробелок PPE и дополнительное терапевтическое средство можно вводить субъекту вместе в единой парентеральной дозированной композиции, такой как солевой раствор или другой физиологически приемлемый раствор, или каждое средство вводят в отдельных парентеральных лекарственных составах. При применении отдельных лекарственных составов композиции можно вводить фактически в одно и то же время, т. е. одновременно, или в отдельные моменты времени, т. е. последовательно и в любом порядке; под комбинированной терапией понимают все такие режимы.

Также предусмотрены наборы для ухода за пациентом, включающие (a) по меньшей мере один модифицированный белок или пробелок PPE, который описан в данном документе; и необязательно (b) по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, иммунотерапевтическое средство, химиотерапевтическое средство, гормональное терапевтическое средство, ингибитор киназы). В определенных наборах (a) и (b) находятся в отдельных терапевтических композициях. В некоторых наборах (a) и (b) находятся в одной и той же терапевтической композиции.

Наборы по данному документу могут также включать одно или более дополнительных терапевтических средств или других компонентов, подходящих или требуемых для подвергнутого лечению показания или для требуемого диагностического применения. Наборы по данному документу могут также включать один или более шприцев или другие компоненты, необходимые или требуемые для облегчения предполагаемого способа доставки (например, стенты, имплантируемые депо и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления набор для ухода за пациентом содержит отдельные контейнеры, разделители или отсеки для композиции(-ий) и информационного(-ых) материала(-ов). Например, композиция(-ии) может(могут) содержаться в бутылке, флаконе или шприце, а информационный(-ые) материал(-ы) может(могут) содержаться в связке с контейнером. В некоторых вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в едином, неразделенном контейнере. Например, композиция содержится во бутылке, флаконе или шприце, к которым прикреплен информационный материал в форме этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор включает множество (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или более стандартных лекарственных форм (например, описанную в данном документе лекарственную форму) с модифицированным белком или пробелком PPE и необязательно по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Например, набор включает несколько шприцев, ампул, пакетов из фольги или блистерных упаковок, каждая из которых содержит одну стандартную дозу модифицированного белка или пробелка PPE и необязательно по меньшей мере

одного дополнительного терапевтического средства. Контейнеры из наборов могут быть воздухонепроницаемыми, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми для изменения влажности или испарения) и/или светонепроницаемыми.

Набор для ухода за пациентом необязательно включает устройство, подходящее для введения композиции, например, шприц, ингалятор, пипетку (например, глазную пипетку), тампон (например, ватный тампон или ватную палочку) или любое такое устройство для доставки. В некоторых вариантах осуществления устройство представляет собой имплантируемое устройство, которое дозирует отмеренные дозы средства(средств). Также предусмотрены способы получения набора, например, путем комбинирования описанных в данном документе компонентов.

### **Системы экспрессии и очистки**

Определенные варианты осуществления предусматривают способы и родственные композиции для экспрессии и очистки модифицированного белка или пробелка PPE, описанного в данном документе. Такие рекомбинантные модифицированные белки или пробелки PPE можно легко получать с помощью стандартных протоколов, которые описаны, например, в Sambrook, et al., (1989, см. выше), в частности в разделах 16 и 17; Ausubel et al., (1994, см. выше), в частности главы 10 и 16; и Coligan et al., Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), в частности главы 1, 5 и 6. В качестве одного общего примера, модифицированный белок или пробелок PPE можно получить с помощью процедуры, включающей одну или более стадий: (a) получения вектора или конструкции, содержащих полинуклеотидную последовательность, которая кодирует модифицированный белок или пробелок PPE, описанный в данном документе (см., например, **таблицу S2**), которая функционально связана с одним или более регуляторными элементами; (b) введения вектора или конструкции в клетку-хозяина; (c) культивирования клетки-хозяина для экспрессии модифицированного белка или пробелка PPE; и (d) выделения модифицированного белка или пробелка PPE из клетки-хозяина.

Для экспрессии требуемого полипептида нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный белок или пробелок PPE, можно вставить в соответствующий вектор(-ы) экспрессии, т. е. вектор(-ы), который(-ые) содержит(-ат) необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Для построения векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, и соответствующие элементы контроля транскрипции и трансляции, можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области. Данные способы включают методики рекомбинантной ДНК в условиях *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию в условиях *in vivo*. Такие методики описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).

Известен ряд систем векторов экспрессии/хозяев, которые можно применять для содержания в них и экспрессии полинуклеотидных последовательностей. К ним относятся без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные векторами экспрессии на основе ДНК рекомбинантных бактериофагов, плазмид или космид; дрожжи, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; системы на основе клеток насекомых, инфицированные вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом); системы на основе растительных клеток, трансформированные вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или бактериальными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидами или pBR322); или системы на основе клеток животных, в том числе системы на основе клеток млекопитающих и, более конкретно, системы на основе клеток человека.

«Элементы контроля» или «регуляторные последовательности», присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой те нетранслируемые области вектора, такие как энхансеры, промоторы, 5'- и 3'-нетранслируемые области, которые взаимодействуют с белками клеток-хозяев для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут варьироваться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина можно применять любое количество подходящих транскрипционных и трансляционных элементов, в

том числе конститутивные и индуцируемые промоторы. Например, при клонировании в бактериальных системах можно применять индуцируемые промоторы, такие как гибридный промотор *lacZ* фагмиды PBLUESCRIPT (Stratagene, Ла-Хойя, штат Калифорния, США) или плазмиды PSPORT1 (Gibco BRL, Гейтерсберг, штат Мэриленд, США) и т. п. В системах на основе клеток млекопитающих обычно предпочтительны промоторы из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Если необходимо получить линию клеток, содержащую несколько копий последовательности, кодирующей полипептид, можно преимущественно применять векторы на основе SV40 или EBV с соответствующим селектируемым маркером.

В бактериальных системах можно выбрать ряд векторов экспрессии в зависимости от назначения экспрессируемого полипептида. Например, когда необходимы большие количества, можно применять векторы, которые управляют высоким уровнем экспрессии слитых белков, которые легко подвергаются очистке. К таким векторам относятся без ограничения многофункциональные векторы для клонирования и экспрессии в *E. coli*, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых последовательность, кодирующая представляющий интерес полипептид, может быть лигирована в вектор в рамку считывания с последовательностями для аминоконцевого Met и последующих 7 остатков  $\beta$ -галактозидазы, так чтобы продуцировался гибридный белок; векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)); и тому подобное. Также можно применять векторы pGEX (Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США) для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). Обычно такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем адсорбции на глутатион-агарозных гранулах с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Белки, полученные в таких системах, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали участки расщепления гепарином, тромбином или протеазой фактора Ха с тем, чтобы представляющий интерес клонированный полипептид можно было при желании освободить от GST-фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления применяют системы экспрессии на основе *E. coli* (см., например, Structural Genomics Consortium et al., *Nature Methods*. 5:135-146, 2008). Такие и родственные варианты осуществления могут частично или полностью основываться на независимом от лигирования клонирования (LIC) для получения подходящего вектора экспрессии. В конкретных вариантах осуществления экспрессия белка может контролироваться РНК-полимеразой T7 (например, серия векторов pET). В таких и связанных вариантах осуществления можно применять экспрессирующий штамм-хозяин BL21(DE3), лизоген  $\lambda$ DE3 из BL21, который поддерживает T7-опосредованную экспрессию и лишен протеаз *lon* и *ompT* для повышения стабильности целевого белка. Также предусмотрены экспрессионные штаммы-хозяева, несущие плазмиды, кодирующие tРНК, редко используемые в *E. coli*, такие как штаммы ROSETTA™ (DE3) и Rosetta 2 (DE3). Лизис клеток и обращение с образцами также можно улучшить с помощью реагентов, продаваемых под торговыми марками нуклеаза BENZONASE® и реагент для экстракции белка BUGBUSTER®. В случае клеточных культур эффективность многих систем экспрессии, в том числе высокоэффективных систем экспрессии, могут повысить автоиндуцирующие среды. Среда данного типа (например, автоиндукционная система OVERNIGHT EXPRESS™) постепенно вызывают экспрессию белка посредством метаболического сдвига без добавления искусственных индуцирующих средств, таких как IPTG. В отдельных вариантах осуществления применяют гексагистидиновые метки (такие как продаваемые под торговой маркой HIS•TAG® fusions) с последующей очисткой аффинной хроматографией с иммобилизованным металлом (IMAC) или родственными методиками. Тем не менее, в определенных аспектах белки клинического качества могут быть выделены из телец включения *E. coli* без использования или без применения аффинных меток (см., например, Shimp et al., *Protein Expr Purif*. 50:58-67, 2006). В качестве дополнительного примера, в некоторых вариантах осуществления можно применять индуцируемую холодным шоком систему высокопродуктивного продуцирования в *E. coli*, поскольку сверхэкспрессия белков в *Escherichia coli* при низкой температуре улучшает их растворимость и стабильность (см., например, Qing et al., *Nature Biotechnology*. 22:877-882, 2004).

Также предусмотрены системы бактериальной ферментации с высокой плотностью. Например, культивирование *Ralstonia eutropha* с высокой плотностью клеток позволяет получить белок при значениях плотности клеток более 150 г/л и экспрессировать рекомбинантные белки в титрах, превышающих 10 г/л.

В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* можно применять ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как промоторы гена альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH. Обзоры см. в Ausubel et al. (см. выше) и Grant et al., *Methods Enzymol.* 153:516-544 (1987). Также предусмотрены системы экспрессии в *Pichia pastoris* (см., например, Li et al., *Nature Biotechnology.* 24, 210 – 215, 2006; и Hamilton et al., *Science*, 301:1244, 2003). Некоторые варианты осуществления предусматривают дрожжевые системы, которые сконструированы для селективного гликозилирования белков, в том числе, помимо прочих, дрожжи, которые имеют гуманизированные пути N-гликозилирования (см., например, Hamilton et al., *Science.* 313:1441-1443, 2006; Wildt et al., *Nature Reviews Microbiol.* 3:119-28, 2005; и Gerngross et al., *Nature-Biotechnology.* 22:1409 -1414, 2004; патенты США № 7629163, 7326681 и 7029872). Лишь в качестве примера, рекомбинантные культуры дрожжей можно выращивать, помимо прочих, в колбах Фернбаха или ферментерах на 15 л, 50 л, 100 л и 200 л.

В случаях, когда применяют растительные векторы экспрессии, экспрессия последовательностей, кодирующих полипептиды, может управляться любым из ряда промоторов. Например, вирусные промоторы, такие как промоторы 35S и 19S CaMV, можно применять отдельно или в комбинации с омега-лидерной последовательностью из TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). В качестве альтернативы, можно применять растительные промоторы, такие как промоторы гена малой субъединицы RUBISCO или белка теплового шока (Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie et al., *Science* 224:838-843 (1984); и Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105 (1991)). Такие конструкции можно ввести в растительные клетки путем прямой трансформации ДНК или патоген-опосредованной трансфекции. Такие методики описаны в ряде общедоступных обзоров (см., например, Hobbs in McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, pp. 191-196 (1992)).

Для экспрессии представляющего интерес полипептида также можно применять систему для насекомых. Например, в одной такой системе вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) применяют в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или в клетках *Trichoplusia*. Последовательности, кодирующие полипептид, можно клонировать в не несущественную область вируса, такую как ген полиэдрина, и поместить под контроль полиэдринового промотора. Успешная вставка последовательности, кодирующей полипептид, сделает ген полиэдрина неактивным и даст рекомбинантный вирус без белка оболочки. Затем рекомбинантные вирусы можно применять для инфицирования, например, клеток *S. frugiperda* или клеток *Trichoplusia*, в которых может экспрессироваться представляющий интерес полипептид (Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:3224-3227 (1994)). Также предусмотрены бакуловирусные системы экспрессии, в том числе те, которые используют клетки SF9, SF21 и T. ni (см., например, Murphy and Piwnica-Worms, Curr Protoc Protein Sci. Chapter 5:Unit 5.4, 2001). Системы для насекомых могут обеспечивать посттрансляционные модификации, которые аналогичны системам для млекопитающих.

В клетках-хозяевах млекопитающих обычно доступен ряд систем экспрессии на основе вирусов. Например, в случаях, когда в качестве вектора экспрессии применяют аденовирус, последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, можно лигировать в транскрипционный/трансляционный комплекс аденовируса, состоящий из позднего промотора и трехчастной лидерной последовательности. Для получения жизнеспособного вируса, способного экспрессировать полипептид в инфицированных клетках-хозяевах, можно применять вставку в несущественную область E1 или E3 вирусного генома (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3655-3659 (1984)). Кроме того, для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих можно применять энхансеры транскрипции, такие как энхансер вируса саркомы Рауса (RSV).

Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию CV1 почки обезьяны, трансформированную посредством SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293,

субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячков (ВНК, ATCC CCL 10); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TR1 (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки 5 MRC; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2). К другим применимым линиям клеток-хозяев млекопитающих относятся клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *PNAS USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как NSO и Sp2/0. Обзор определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продуцирования белка, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K.C Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268. Некоторые определенные системы экспрессии в клетках млекопитающих включают системы экспрессии на основе клеток CHO и HEK293. В системах экспрессии у млекопитающих можно применять прикрепленные линии клеток, например, в Т-образных колбах, роллерных флаконах или клеточных фабриках, или суспензионные культуры, например, в центрифугах объемом 1 л и 5 л, в биореакторах с мешалками объемом 5 л, 14 л, 40 л, 100 л и 200 л или биореакторах волнового типа объемом 20/50 л и 100/200 л, помимо прочих известных в уровне техники.

Также предусмотрена бесклеточная экспрессия белков. В таких и родственных вариантах осуществления обычно применяют очищенную РНК-полимеразу, рибосомы, тРНК и рибонуклеотиды; данные реагенты можно получать путем экстракции из клеток или из системы экспрессии на основе клеток.

Для достижения более эффективной трансляции последовательностей, кодирующих представляющий интерес полипептид, также можно применять конкретные сигналы инициации. Такие сигналы включают кодон инициации ATG

и соседние последовательности. В тех случаях, когда в соответствующий вектор экспрессии встроены последовательности, кодирующие полипептид, его кодон инициации и расположенные выше последовательности, тогда могут не требоваться дополнительные сигналы контроля транскрипции или трансляции. Однако в случаях, когда вставлена только кодирующая последовательность или ее часть, будут необходимы экзогенные сигналы контроля трансляции, в том числе кодон инициации ATG. Более того, для обеспечения трансляции всей вставки кодон инициации должен находиться в правильной рамке считывания. Экзогенные трансляционные элементы и кодоны инициации могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно повысить за счет включения энхансеров, подходящих для конкретной применяемой клеточной системы, таких как описанные в литературе (Scharf. et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125-162 (1994)).

Кроме того, штамм клеток-хозяев можно выбрать по его способности модулировать экспрессию вставленных последовательностей или требуемым образом процессировать экспрессированный белок. К таким модификациям полипептида относятся без ограничения посттрансляционные модификации, такие как ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. Для облегчения правильной вставки, фолдинга и/или функционирования также можно применять посттрансляционный процессинг, который расщепляет «препро»-форму белка. Для обеспечения надлежащей модификации и процессинга чужеродного белка можно выбрать различные клетки-хозяева, такие как дрожжи, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 и W138, помимо бактериальных клеток, которые имеют или даже не имеют специфического клеточного механизма и характерных механизмов для такой посттрансляционной активности.

Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков обычно предпочтительна стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют представляющий интерес полинуклеотид, можно трансформировать с помощью векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные точки начала репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и

селектируемый маркерный ген в том же или в отдельном векторе. После введения вектора клетки можно оставить расти в течение приблизительно 1-2 суток в обогащенной среде, прежде чем их переведут на селективную среду. Назначение селектируемого маркера заключается в том, чтобы придать устойчивость к селекционному фактору, а его наличие делает возможным рост и выделение клеток, которые успешно экспрессируют внесенные последовательности. Устойчивые клоны стабильно трансформированных клеток можно подвергать пролиферации с помощью методик культивирования тканей, подходящих для данного типа клеток. Также можно применять временное продуцирование, такое как временная трансфекция или инфекция. Иллюстративные системы экспрессии у млекопитающих, подходящих для временного продуцирования, включают системы на основе HEK293 и CHO.

Для выделения трансформированных или трансдуцированных линий клеток можно применять любое количество селекционных систем. К ним относятся без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 11:223-232 (1977)) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22:817-823 (1990)), которые можно применять в tk- или aprt-клетках соответственно. Кроме того, в качестве основы для селекции можно применять устойчивость к антиметаболитам, антибиотикам или гербицидам; например, dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70 (1980)); npt, который придает устойчивость к аминогликозидам, неомицину и G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); и als или pat, которые придают устойчивость к хлорсульфурону и фосфинотрицинацетилтрансферазе соответственно (Murty, см. выше). Описаны дополнительные селектируемые гены, например, trpB, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8047-51 (1988)). Применение видимых маркеров приобрело популярность благодаря таким маркерам, как зеленый флуоресцентный белок (GFP) и другие флуоресцентные белки (например, RFP, YFP), антоцианы,  $\beta$ -глюкуронидаза и ее субстрат GUS, а также люцифераза и ее субстрат люциферин, которые широко применяют не только для идентификации трансформантов, но и для количественной оценки

степени временной или стабильной экспрессии белка, обусловленной конкретной векторной системой (см., например, Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

Также предусмотрены высокопроизводительные системы продуцирования белка или системы микропродуцирования. В определенных аспектах можно применять, например, слитые гексагистиридиновые метки для экспрессии и очистки белков на рабочих поверхностях, модифицированных хелатами металлов, или Ni-частицах MagneHis (см., например, Kwon et al., *BMC Biotechnol.* 9:72, 2009; и Lin et al., *Methods Mol Biol.* 498:129-41, 2009)). Также предусмотрены высокопроизводительные бесклеточные системы экспрессии белка (см., например, Sitaraman et al., *Methods Mol Biol.* 498:229-44, 2009).

В уровне техники известны различные протоколы для выявления и измерения уровня экспрессии продуктов, кодируемых полинуклеотидами, с применением связывающих средств или антител, таких как поликлональные или моноклональные антитела, специфичные для данного продукта. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-иммуоблоттинг, радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Данные и другие анализы описаны, помимо прочего, в Hampton et al., *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) и Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158:1211-1216 (1983).

Специалистам в данной области известно большое разнообразие меток и методик конъюгации, которые можно применять в различных анализах нуклеиновых кислот и аминокислот. Способы получения меченых гибридизационных или ПЦР-зондов для выявления последовательностей, связанных с полинуклеотидами, включают олигомечение, nick-трансляцию, концевое мечение или ПЦР-амплификацию с применением меченого нуклеотида. В качестве альтернативы, последовательности или любые их части можно клонировать в вектор для продуцирования мРНК-зонда. Такие векторы известны в уровне техники, коммерчески доступны, и их можно применять для синтеза РНК-зондов в условиях *in vitro* путем добавления соответствующей РНК-полимеразы, такой как T7, T3 или SP6, и меченых нуклеотидов. Такие процедуры можно проводить с применением ряда коммерчески

доступных наборов. К подходящим репортерным молекулам или меткам, которые можно применять, относятся радионуклиды, ферменты, флуоресцентные, хемилюминесцентные или хромогенные средства, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и др.

Клетки-хозяева, трансформированные одной или более представляющими интерес полинуклеотидными последовательностями, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и выделения белка из клеточной культуры. В определенных вариантах осуществления применяют бессывороточные клеточные системы экспрессии. Примеры включают клетки HEK293 и клетки CHO, которые можно выращивать в бессывороточной среде (см., например, Rosser et al., *Protein Expr. Purif.* 40:237–43, 2005; и патент США № 6210922).

Модифицированный белок или пробелок PPE, продуцируемый рекомбинантной клеткой, может секретироваться или содержаться внутри клетки в зависимости от применяемой последовательности и/или вектора. Как будет понятно специалистам в данной области, векторы экспрессии, содержащие полинуклеотиды, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали сигнальные последовательности, которые управляют секрецией кодируемого полипептида через мембрану прокариотической или эукариотической клетки. Другие рекомбинантные конструкции можно применять для соединения последовательностей, кодирующих представляющий интерес полипептид, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептидный домен, что облегчит очистку и/или обнаружение растворимых белков. Примеры таких доменов включают расщепляемые и нерасщепляемые метки для аффинной очистки и метки-эпитопы, такие как авидин, метки FLAG, полигистидиновые метки (например, 6xHis), метки cMyc, метки V5, метки на основе глутатион-S-трансферазы (GST) и другие.

Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, можно очистить и охарактеризовать согласно ряду методик, известных из уровня техники. К иллюстративным системам для проведения очистки белков и анализа степени чистоты белков относятся быстрая жидкостная хроматография белков (FPLC) (например, системы FPLC от АКТА и Bio-Rad), высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) (например, HPLC от Beckman и Waters). К иллюстративным

химическим способам очистки относятся ионообменная хроматография (например, Q, S), эксклюзионная хроматография, солевые градиенты, аффинная очистка (например, Ni, Co, FLAG, мальтоза, глутатион, белок A/G), гель-фильтрация, обращенно-фазовая ионообменная хроматография на керамических гранулах HYPERD® и колонки гидрофобного взаимодействия (HIC), помимо прочих, которые известны в уровне техники. Также предусмотрены аналитические способы, такие как SDS-PAGE (например, с окраской кумасси, серебром), иммуноблоттинг, способ Бредфорда и ELISA, которые можно применять на любой стадии процесса получения или очистки, обычно для измерения степени чистоты белковой композиции.

Также предусмотрены способы концентрирования модифицированного белка или пробелка PPE и композиции, содержащие концентрированный растворимый модифицированный белок или пробелок PPE. В некоторых аспектах такие концентрированные растворы модифицированного белка или пробелка PPE содержат белки в концентрации приблизительно или по меньшей мере приблизительно 5 мг/мл, 8 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл или более.

В некоторых аспектах такие композиции могут быть практически монодисперсными, что означает, что модифицированный белок или пробелок PPE существует преимущественно (т. е. по меньшей мере приблизительно на 90% или больше) в форме с одним кажущимся молекулярным весом при оценке, например, с помощью эксклюзионной хроматографии, динамического светорассеяния или аналитического ультрацентрифугирования.

В некоторых аспектах такие композиции имеют степень чистоты (в пересчете на белок) по меньшей мере приблизительно 90%, или в некоторых аспектах по меньшей мере приблизительно 95% степень чистоты, или в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 98% степень чистоты. Степень чистоты можно определить с помощью любого стандартного аналитического способа, известного в уровне техники.

В некоторых аспектах такие композиции характеризуются содержанием высокомолекулярных агрегатов менее приблизительно 10% по сравнению с общим

количеством присутствующего белка, или в некоторых вариантах осуществления такие композиции характеризуются содержанием высокомолекулярных агрегатов менее приблизительно 5%, или в некоторых аспектах такие композиции характеризуются содержанием высокомолекулярных агрегатов менее приблизительно 3%, или в некоторых вариантах осуществления содержание высокомолекулярных агрегатов составляет менее приблизительно 1%. Содержание высокомолекулярных агрегатов можно определить с помощью ряда аналитических методик, в том числе, например, эксклюзионной хроматографии, динамического светорассеяния или аналитического ультрацентрифугирования.

Примеры рассматриваемых в данном документе подходов к концентрированию включают лиофилизацию, которую обычно применяют, когда раствор содержит мало растворимых компонентов, отличных от представляющего интерес белка. Лيوфилизацию зачастую проводят после HPLC, и она позволяет удалить большую часть или все летучие компоненты из смеси. Также предусмотрены методики ультрафильтрации, в которых обычно применяют одну или более селективных проницаемых мембран для концентрирования белкового раствора. Мембрана позволяет проходить воде и малым молекулам и удерживает белок; раствор можно нагнетать на мембрану, помимо прочих методик, с помощью механического насоса, давления газа или центрифугирования.

В определенных вариантах осуществления модифицированный белок или пробелок PPE в композиции имеет степень чистоты по меньшей мере приблизительно 90% при измерении в соответствии со стандартными методиками в уровне техники. В определенных вариантах осуществления, таких как диагностические композиции или некоторые фармацевтические или терапевтические композиции, модифицированный белок или пробелок PPE в композиции имеет степень чистоты по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или 98%, или 99%. В некоторых вариантах осуществления, например, при применении в качестве эталонных или исследовательских реагентов, модифицированный белок или пробелок PPE может иметь меньшую степень чистоты и может иметь степень чистоты по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70% или 80%. Степень чистоты можно измерять в целом или по отношению к

выбранным компонентам, таким как другие белки, например, степень чистоты в пересчете на белок.

Очищенные белки также можно охарактеризовать по их биологическим характеристикам. Аффинность связывания и кинетику связывания можно измерить с помощью ряда методик, известных в уровне техники, таких как Biacore® и родственные технологии, в которых применяют поверхностный плазмонный резонанс (SPR), оптическое явление, позволяющее выявить немеченые взаимодействующие вещества в режиме реального времени. Биосенсоры на основе SPR можно применять для определения концентрации активного вещества, скрининга и характеристики в отношении как аффинности, так и кинетики. Присутствие или уровни одной или более биологических активностей можно измерить согласно анализам *in vitro* или клеточным анализам, которые необязательно функционально связаны со считыванием или таким индикатором, как флуоресцентный или люминесцентный индикатор биологической активности, который описан в данном документе.

В определенных вариантах осуществления, как отмечалось выше, композиция практически не содержит эндотоксин, в том числе, например, на приблизительно 95% свободна от эндотоксина, на предпочтительно приблизительно 99% свободна от эндотоксина и более предпочтительно на приблизительно 99,99% свободна от эндотоксина. Наличие эндотоксинов можно обнаружить согласно стандартным методикам из уровня техники, которые описаны в данном документе. В конкретных вариантах осуществления модифицированный белок или пробелок PPE получают из эукариотической клетки, такой как клетка млекопитающего или человека, в практически бессывороточной среде. В определенных вариантах осуществления, как отмечалось в данном документе, композиция имеет содержание эндотоксина менее приблизительно 10 МЕ/мг белка или менее приблизительно 5 МЕ/мг белка, менее приблизительно 3 МЕ/мг белка или менее приблизительно 1 ЕЕ/мг белка.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит менее приблизительно 10% вес/вес высокомолекулярных агрегатов, или менее приблизительно 5% вес/вес высокомолекулярных агрегатов, или менее

приблизительно 2% вес/вес высокомолекулярных агрегатов, или менее приблизительно 1% вес/вес высокомолекулярных агрегатов.

Также предусмотрены белковые аналитические анализы и способы, которые можно применять для оценки, например, степени чистоты белка, его размера, растворимости и степени агрегации, помимо прочих характеристик. Степень чистоты белка можно оценить несколькими способами. Например, степень чистоты можно оценить на основе первичной структуры, структуры более высокого порядка, размера, заряда, гидрофобности и гликозилирования. Примеры способов оценки первичной структуры включают N- и C-концевое секвенирование и пептидное картирование (см., например, Allen et al., *Biologicals*. 24:255-275, 1996)). Примеры способов оценки структуры более высокого порядка включают круговой дихроизм (см., например, Kelly et al., *Biochim Biophys Acta*. 1751:119-139, 2005), флуоресцентную спектроскопию (см., например, Meagher et al., *J. Biol. Chem.* 273:23283-89, 1998), FT-IR, кинетику обмена амидного водорода и дейтерия, дифференциальную сканирующую калориметрию, NMR-спектроскопию, иммунореактивность с конформационно чувствительными антителами. Структуру более высокого порядка также можно оценить в зависимости от ряда параметров, таких как pH, температура или добавленные соли. Примеры способов оценки характеристик белка, таких как размер, включают аналитическое ультрацентрифугирование и эксклюзионную HPLC (SEC-HPLC), а примеры способов измерения заряда включают ионообменную хроматографию и изоэлектрическое фокусирование. Гидрофобность можно оценить, например, с помощью обращенно-фазовой HPLC и HPLC-хроматографии гидрофобных взаимодействий. Гликозилирование может влиять на фармакокинетику (например, клиренс), конформацию или стабильность, связывание с рецептором и функцию белка, и его можно оценить, например, с помощью масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (NMR).

Как отмечалось выше, определенные варианты осуществления предусматривают применение SEC-HPLC для оценки таких характеристик белка, как чистота, размер (например, однородность по размеру) или степень агрегации и/или для очистки белков, помимо прочих вариантов применения. SEC, также включая гель-

фильтрационную хроматографию (GFC) и гель-проникающую хроматографию (GPC), относится к хроматографическому способу, в котором молекулы в растворе разделяют в пористом материале по их размеру или, более конкретно, их гидродинамическому объему, коэффициенту диффузии и/или поверхностным свойствам. Данный процесс обычно применяют для разделения биологических молекул, а также для определения значений молекулярного веса и молекулярно-весового распределения полимеров. Обычно, биологический или белковый образец (такой как белковый экстракт, полученный в соответствии со способами экспрессии белка, представленными в данном документе и известными в уровне техники) загружают в выбранную колонку для эксклюзионной хроматографии с определенной неподвижной фазой (пористым материалом), предпочтительно фазой, которая не взаимодействует с белками в образце. В определенных аспектах неподвижная фаза состоит из инертных частиц, упакованных в плотную трехмерную матрицу внутри стеклянной или стальной колонки. Подвижной фазой может быть чистая вода, водный буфер, органический растворитель или их смесь. Частицы неподвижной фазы обычно имеют небольшие поры и/или каналы, которые позволяют проникать только молекулам меньше определенного размера. Следовательно, из этих пор и каналов исключаются крупные частицы, и их ограниченное взаимодействие с неподвижной фазой приводит к тому, что они элюируются в виде «полностью исключенного» пика в начале эксперимента. Молекулы меньшего размера, которые могут поместиться в поры, удаляются из протекающей подвижной фазы, а время, которое они проводят иммобилизованными в порах неподвижной фазы, частично зависит от того, насколько глубоко они проникают в поры. Их удаление из потока подвижной фазы приводит к тому, что им необходимо больше времени для элюирования из колонки, что приводит к разделению частиц на основе различий по их размеру. Колонка для эксклюзионной хроматографии заданного размера характеризуется диапазоном значений молекулярного веса, которые можно разделить. В целом, молекулы, которые больше верхнего предела, не будут захватываться неподвижной фазой, молекулы, которые меньше нижнего предела, будут полностью входить в твердую фазу и элюироваться в виде единого бэнда, а молекулы, которые находятся в пределах данного диапазона, будут элюироваться с разной скоростью,

определяемой такими их свойствами, как гидродинамический объем. Примеры данных способов для работы на практике с фармацевтическими белками см. в Bruner et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15: 1929-1935, 1997.

Степень чистоты белков для задач клинического применения также рассмотрены, например, у Anicetti и соавт. (*Trends in Biotechnology*. 7:342-349, 1989). Более современные методики анализа степени чистоты белка включают без ограничения LabChip GXII, автоматизированную платформу для быстрого анализа белков и нуклеиновых кислот, которая производит высокопроизводительный анализ титра, разделяет по размеру и производит анализ степени чистоты белков. В определенных неограничивающих вариантах осуществления белки с клинической степенью чистоты можно получать путем применения комбинации хроматографических материалов в по меньшей мере двух ортогональных стадиях, помимо прочих способов (см., например, *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols*. Vol. 308, Eds., Smales and James, Humana Press Inc., 2005). Как правило, белковые средства практически не содержат эндотоксинов, что измеряют в соответствии с методиками, известными в уровне техники и описанными в данном документе.

Также предусмотрены анализы растворимости белков. Такие анализы можно применять, например, для определения оптимальных условий роста и очистки в ходе рекомбинантного получения, для оптимизации выбора буфера(-ов) и для оптимизации выбора модифицированного белка или пробелка PPE и их вариантов. Растворимость или агрегацию можно оценить по целому ряду параметров, включая температуру, pH, содержание солей и присутствие или отсутствие других добавок. Примеры скрининговых анализов растворимости включают, без ограничения и помимо прочих, микропланшетные способы измерения растворимости белков с помощью мутности или других показателей в качестве конечной точки, высокопроизводительные анализы для анализа растворимости очищенных рекомбинантных белков (см., например, Stenvall et al., *Biochim Biophys Acta*. 1752:6-10, 2005), анализы, в которых применяют структурную комплементацию белка генетического маркера для отслеживания и измерения фолдинга и растворимости белка в условиях *in vivo* (см., например, Wigley et al., *Nature*

Biotechnology. 19:131-136, 2001), и электрохимический скрининг растворимости рекомбинантного белка в *Escherichia coli* с помощью сканирующей электрохимической микроскопии (SECM) (см., например, Nagamine et al., Biotechnology and Bioengineering. 96:1008-1013, 2006). Модифицированный белок или пробелок PPE с повышенной растворимостью (или пониженной агрегацией) можно идентифицировать или отобрать согласно стандартным методикам, известным в уровне техники, включая простые анализы растворимости белка в условиях *in vivo* (см., например, Maxwell et al., Protein Sci. 8:1908-11, 1999).

Растворимость и агрегацию белков также можно измерить с помощью методик динамического светорассеяния. «Агрегация» является общим термином, который охватывает несколько типов взаимодействий или характеристик, в том числе растворимые/нерастворимые, ковалентные/нековалентные, обратимые/необратимые и нативные/денатурированные взаимодействия и характеристики. В случае белковых терапевтических средств присутствие агрегатов обычно считается нежелательным по причине опасения того, что агрегаты могут вызывать иммуногенную реакцию (например, небольшие агрегаты) или могут вызывать нежелательные явления при введении (например, частицы). Динамическое светорассеяние относится к методике, которую можно применять для определения профиля распределения по размерам небольших частиц в суспензии или полимеров, таких как белки в растворе. Такая методика, также называемая фотонно-корреляционной спектроскопией (PCS) или квазиупругим рассеянием света (QELS), в которой применяют рассеянный свет для измерения скорости диффузии белковых частиц. Флуктуации интенсивности рассеяния могут наблюдаться по причине броуновского движения молекул и частиц в растворе. Такие данные о движении можно обработать традиционным способом с получением распределения размеров в образце, где размер задан радиусом Стокса или гидродинамическим радиусом белковой частицы. Гидродинамический размер зависит как от массы, так и от формы (конформации). Динамическое рассеяние позволяет обнаружить присутствие очень малых количеств агрегированного белка (<0,01% по весу) даже в образцах, содержащих молекулы с большим диапазоном масс. Его также можно применять для сравнения стабильности различных составов, в том числе, например, в задачах, основанных на отслеживании

изменений в реальном времени при повышенных температурах. Соответственно, определенные варианты осуществления предусматривают применение динамического светорассеяния для анализа растворимости и/или присутствия агрегатов в образце, содержащем модифицированный белок или пробелок PPE по настоящему изобретению.

Несмотря на то, что с целью ясности понимания вышеприведенные варианты осуществления были подробно описаны посредством иллюстрации и примера, специалисту в данной области в свете идей настоящего изобретения будет сразу очевидно, что можно внести определенные изменения и модификации без отступления от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Последующие примеры приведены лишь в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Специалистам в данной области будет хорошо известен ряд некритических параметров, которые можно изменить или модифицировать для получения фактически аналогичных результатов.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

#### Активность мутантов PPE

Получали и тестировали десять мутантов белков свиной панкреатической эластазы (PPE). Мутантов получали в форме ферментативно-неактивных пробелков PPE, содержащих N-концевой модифицированный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 2) и расщепляемый трипсином активационный пептид (SEQ ID NO: 3), мутантный пептидазный домен PPE и C-концевую 6xHis метку. Обозначения мутантов приведены в представленной ниже **таблице E1**, при этом нумерация остатков определена относительно SEQ ID NO: 1.

<b>Таблица E1. Мутанты PPE</b>	
<b>Обозначение мутанта</b>	<b>Мутация (положение а. к.)</b>

Мутант А	N241A
Мутант В	N241Y
Мутант С	R75A
Мутант D	R75E
Мутант E	Q211A
Мутант F	Q211F
Мутант G	R237A
Мутант H	T55A
Мутант I	S214A
Мутант J	D74A

Для тестирования активации модифицированных пробелков PPE нативный PPE (дикого типа, активный пептидазный домен PPE), пробелок PPE дикого типа (также про-PPE) и модифицированные пробелки PPE (мутанты А-J) инкубировали с трипсином (трипсин:PPE в соотношении 1:20 вес/вес) в течение различных интервалов времени (0-24 часа). Расщепление отслеживали с помощью SDS-PAGE и окрашивания посредством кумасси синего. Как показано в **фиг. 1A-1D**, трипсин расщеплял пробелки PPE дикого типа и модифицированные пробелки PPE с образованием бэнда того же размера, что и нативная PPE, и реакция расщепления завершалась через 2 часа инкубации. Из результатов дополнительно видно, что продолжительная инкубация с трипсином не приводит к дополнительному расщеплению, что свидетельствует о том, что трипсин дополнительно не расщепляет про-PPE-формы после первоначального превращения в активную PPE. Действительно, инкубация нативной PPE (активного пептидазного домена PPE) с трипсином не приводила к появлению более низкомолекулярных бэндов (см. **фиг. 1A**).

Для тестирования ферментативной активности активированных трипсином пробелков белок PPE дикого типа и модифицированные пробелки PPE (мутанты А-Д) инкубировали со средой-носителем (Veh) или с трипсином (трипсин:PPE в соотношении 1:20 вес/вес) в течение 6 часов при 37°C (n=4/условие). Каталитическую активность отслеживали с помощью колориметрического анализа активности субстрата (N-метоксисукцинил-Ala-Ala-Pro-Val-п-нитроанилида; Sigma). Результаты, представленные на **фиг. 2А**, свидетельствуют о повышенной ферментативной активности модифицированных PPE после расщепления трипсином.

Для тестирования ферментативной активности активированных трипсином пробелков в присутствии ингибитора сериновой протеазы эластазы человеческих нейтрофилов дикого типа (ELANE), (активированного) белка PPE дикого типа (также нативной PPE), пробелка PPE дикого типа (также rPPE WT) и (активированных) модифицированных белков PPE инкубировали с различными дозами альфа-1-антитрипсина человека (A1AT; 0-20 нМ) в течение 30 минут при комнатной температуре и производили количественную оценку каталитической активности. Чувствительность к A1AT оценивали с помощью линейнорегрессионного анализа снижения ферментативной активности в зависимости от концентрации A1AT (см. приведенную ниже **таблицу E2**; *P*-значение соответствует значимости аппроксимации линейной регрессии).

<b>Таблица E2</b>		
<b>Фермент</b>	<b>Угловой коэффициент</b>	<b>P-значение</b>
ELANE	-3,76	<0,001
Белок PPE WT	-2,06	<0,001
Пробелок PPE WT	-2,68	<0,001
Мутант А	-3,64	<0,001
Мутант С	-2,86	<0,001

Мутант D	-3,94	<0,001
Мутант F	-3,37	<0,001
Мутант G	-2,00	<0,001
<b>Мутант H</b>	<b>-0,80</b>	<b>&lt;0,001</b>
Мутант J	-4,98	<0,001

На **фиг. 2B** продемонстрирована кривая полного ингибирования, на которой изображены результаты сравнения нативного ELANE, белка PPE WT (нативной PPE), пробелка PPE дикого типа (rPPE wt) и мутантной PPE H \*,  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стюдента и представленная ниже **таблица E2**.

Для тестирования цитолитической активности в отношении раковых клеток человеческие раковые клетки MDA-MB-231 (трижды негативного рака молочной железы) инкубировали с белками PPE дикого типа и модифицированными белками PPE в бессывороточной среде в течение 7 часов в присутствии или в отсутствие A1AT (0-40 нМ). Цитолитическую активность в отношении раковых клеток оценивали с помощью кальцеина-AM ( $n=6$ /условие). На **фиг. 3A** показана активность возрастающих доз тестируемых белков, а на **фиг. 3B** показана активность тестируемых белков в отсутствие или в присутствии возрастающих количеств A1AT (цитолитическая эффективность в отношении раковых клеток в отсутствие A1AT была взята за 100%. \*,  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стюдента; относительно PPE дикого типа). Например, у мутанта F (Q211F) наблюдали значимо повышенную цитолитическую активность в отношении раковых клеток по сравнению с PPE дикого типа в сопоставимых дозах (**3A**), а у мутанта H (T55A) наблюдали значимо повышенную цитолитическую активность в отношении раковых клеток по сравнению с диким типом в присутствии возрастающих количеств A1AT (**3B**).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Модифицированный белок свиной панкреатической эластазы (PPE), содержащий по меньшей мере одно аминокислотное изменение относительно белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4), где по меньшей мере одно изменение относится к остатку, выбранному из одного или более из Q211, T55, D74, R75, S214, R237 и N241, при этом нумерация остатков определена по SEQ ID NO: 1 (пробелок PPE дикого типа).

2. Модифицированный белок PPE по п. 1, где по меньшей мере одно аминокислотное изменение выбрано из одного или более из Q211F, T55A, D74A, R75A, R75E, Q211A, S214A, R237A, N241A и N241Y, при этом нумерация остатков определена по SEQ ID NO: 1.

3. Модифицированный белок PPE по п. 1 или п. 2, который содержит, состоит из или по сути состоит из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 100% идентична последовательности, выбранной из **таблицы S2**, и которая сохраняет по меньшей мере одно аминокислотное изменение.

4. Модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-3, который выбран из:

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 5 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211F;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 6 и которая сохраняет аминокислотную замену T55A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 7 и которая сохраняет аминокислотную замену N241A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 8 и которая сохраняет аминокислотную замену N241Y;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 9 и которая сохраняет аминокислотную замену R75A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 10 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 10 и которая сохраняет аминокислотную замену R75E;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 11 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 11 и которая сохраняет аминокислотную замену Q211A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 12 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 12 и которая сохраняет аминокислотную замену R237A;

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 13 и которая сохраняет аминокислотную замену S214A; и

модифицированного белка PPE, который содержит, состоит из или по сути состоит из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 14 и которая сохраняет аминокислотную замену D74A.

5. Модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-4, который обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток относительно активности белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4).

6. Модифицированный белок PPE по п. 5, который обладает повышенной активностью уничтожения раковых клеток, которая в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность уничтожения раковых клеток белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4).

7. Модифицированный белок PPE по п. 5 или п. 6, где повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в отсутствие человеческого белка A1AT *in vitro* или *in vivo*.

8. Модифицированный белок PPE по п. 5 или п. 6, где повышенная активность уничтожения раковых клеток наблюдается в присутствии человеческого белка A1AT *in vitro* или *in vivo*.

9. Модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-8, который характеризуется пониженным связыванием или взаимодействием с человеческим белком альфа-1-антитрипсином (A1AT) относительно белка PPE дикого типа (SEQ ID NO: 4).

10. Модифицированный белок PPE по п. 9, который характеризуется пониженным связыванием с человеческим A1AT, которое в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше ниже связывания белка PPE дикого типа с человеческим белком A1AT.

11. Модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-10, который обладает приблизительно или по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000% или больше активности сериновой протеазы у PPE дикого типа.

12. Модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-10, который обладает повышенной активностью сериновой протеазы по сравнению с PPE дикого типа.

13. Модифицированный белок PPE по п. 12, где активность сериновой протеазы в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность сериновой протеазы у PPE дикого типа при измерении в отсутствие человеческого белка A1AT.

14. Модифицированный белок PPE по п. 11, где активность сериновой протеазы в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше превышает активность сериновой протеазы у PPE дикого типа при измерении в присутствии человеческого белка A1AT.

15. Модифицированный пробелок PPE, содержащий в ориентации от N-конца к С-концу сигнальный пептид (необязательно SEQ ID NO: 2), активационный пептид (необязательно SEQ ID NO: 3) и модифицированный белок PPE по любому из пп. 1-13, где модифицированный пробелок PPE способен активироваться посредством расщепления протеазой активационного пептида с образованием ферментативно активного модифицированного белка PPE.

16. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированный белок или пробелок PPE по любому из пп. 1-14, вектор, содержащий рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, или клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

17. Способ получения модифицированного белка или пробелка PPE, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 15 в условиях культивирования, подходящих для экспрессии модифицированного белка или пробелка PPE, и выделение модифицированного белка или пробелка PPE из культуры.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок или пробелок PPE по любому из пп. 1-14 или экспрессируемый полинуклеотид, кодирующий модифицированный белок или пробелок PPE, и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ лечения, облегчения симптомов и/или уменьшения прогрессирования рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 17.

20. Способ по п. 18, где рак представляет собой первичный рак или метастатический рак и выбран из одного или более из меланомы (необязательно метастатической меланомы), рака молочной железы (необязательно трижды негативного рака молочной железы, TNBC), рака почки (необязательно почечно-клеточной карциномы), рака поджелудочной железы, рака кости, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мезотелиомы, лейкоза (необязательно лимфолейкоза, хронического миелогенного лейкоза, острого миелоидного лейкоза или рецидивирующего острого миелоидного лейкоза), множественной миеломы, лимфомы, гепатомы (гепатоклеточной карциномы), саркомы, В-клеточного злокачественного новообразования, рака яичников, колоректального рака, глиомы, мультиформной глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, первичной лимфомы ЦНС, примитивной нейроэктодермальной опухоли (медуллобластомы), рака мочевого пузыря, рака матки, рака пищевода, рака головного мозга, различных форм рака головы и шеи, рака шейки матки, рака яичка, рака щитовидной железы и рака желудка.

21. Способ по п. 18 или п. 19, где фармацевтическая композиция содержит модифицированный пробелок PPE, который активируется в результате расщепления протеазой активационного пептида в раковой ткани или месте локализации опухоли нуждающегося в этом субъекта с образованием ферментативно активного модифицированного белка PPE.

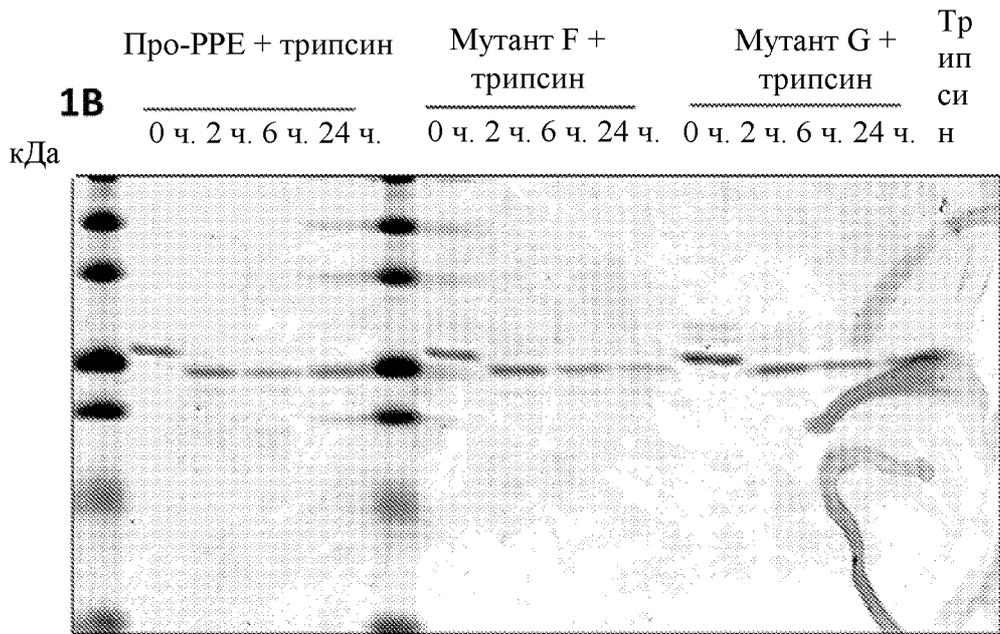
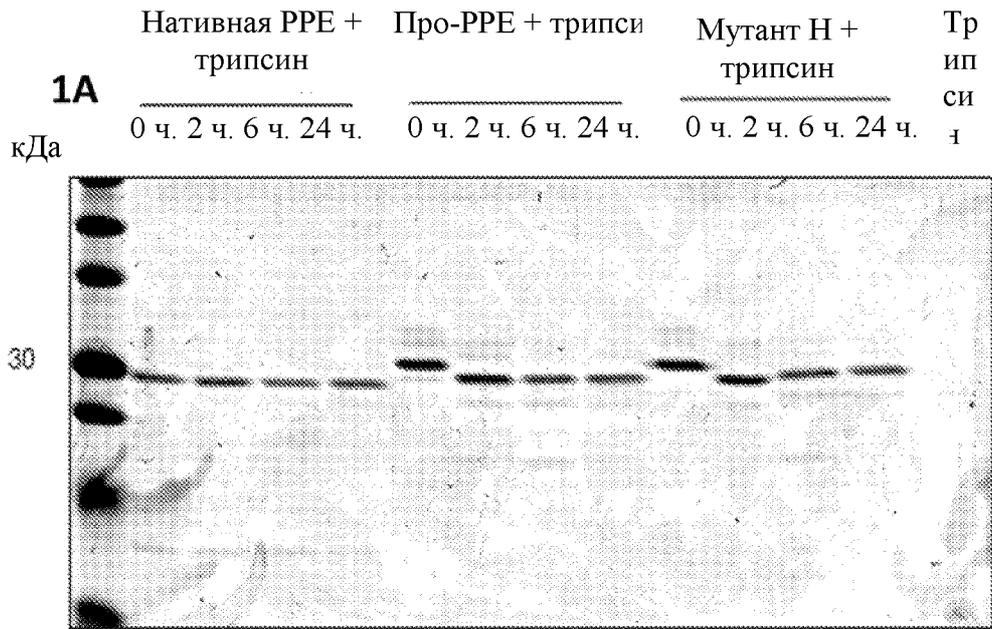
22. Способ по любому из пп. 18-20, где введение фармацевтической композиции увеличивает уничтожение раковых клеток у субъекта в приблизительно или по меньшей мере приблизительно 2 раза, 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 500 раз или 1000 раз или больше относительно контроля или эталона.

23. Способ по любому из пп. 18-21, где введение фармацевтической композиции приводит к регрессии опухоли у субъекта, на что необязательно

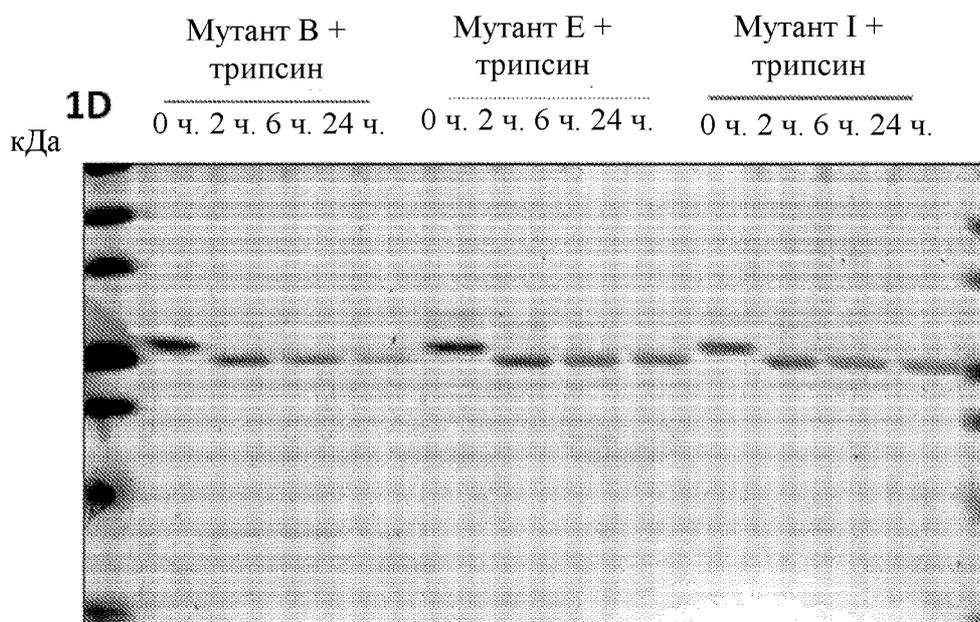
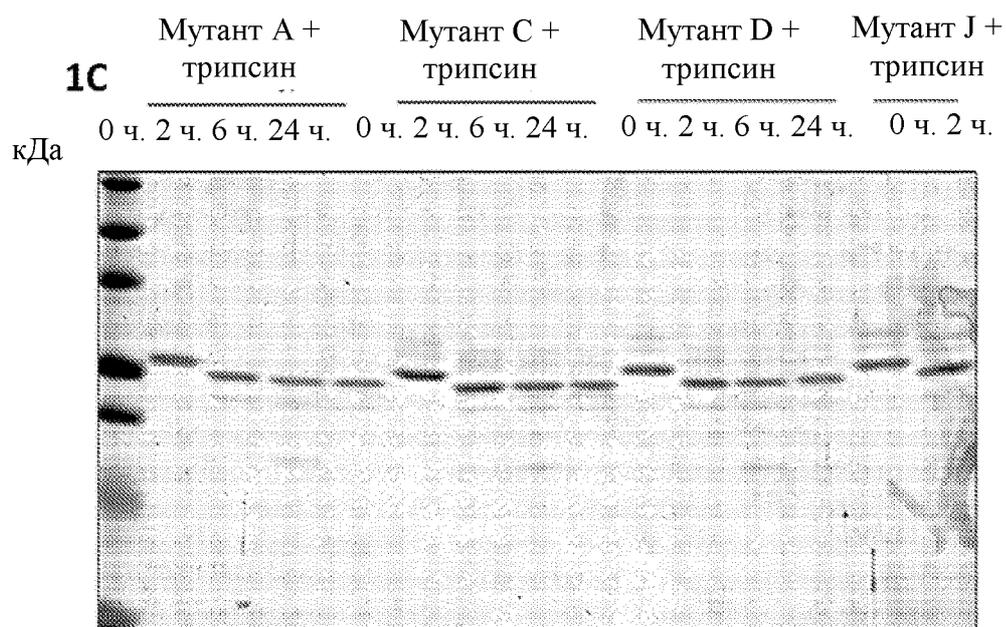
указывает статистически значимое уменьшение величины жизнеспособной опухоли или опухолевой массы, необязательно уменьшение опухолевой массы на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или больше.

24. Способ по любому из пп. 18-22, включающий введение субъекту фармацевтической композиции путем парентерального введения или внутриопухолевого введения.

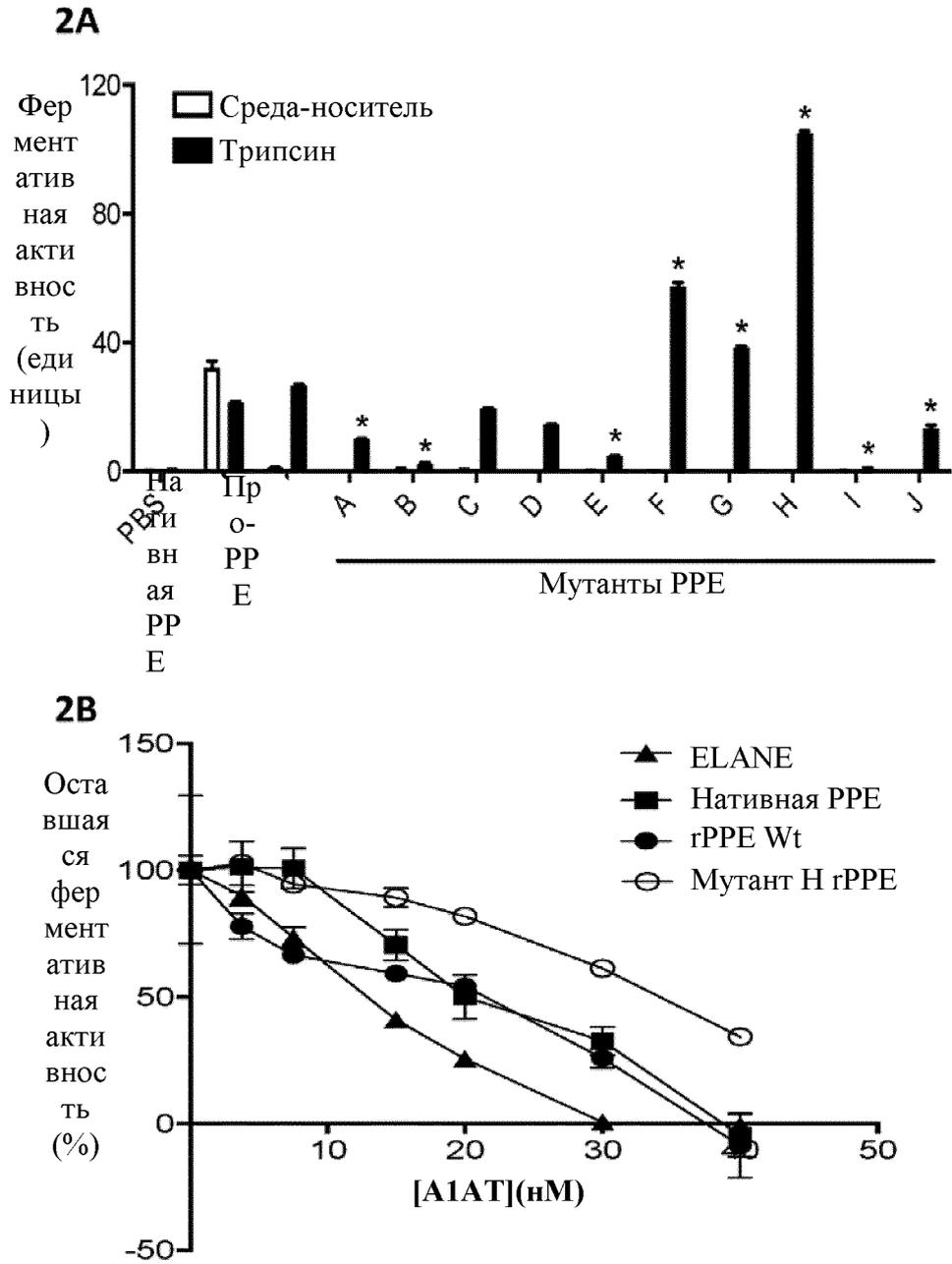
25. Способ по п. 23, где парентеральное введение представляет собой внутривенное введение.



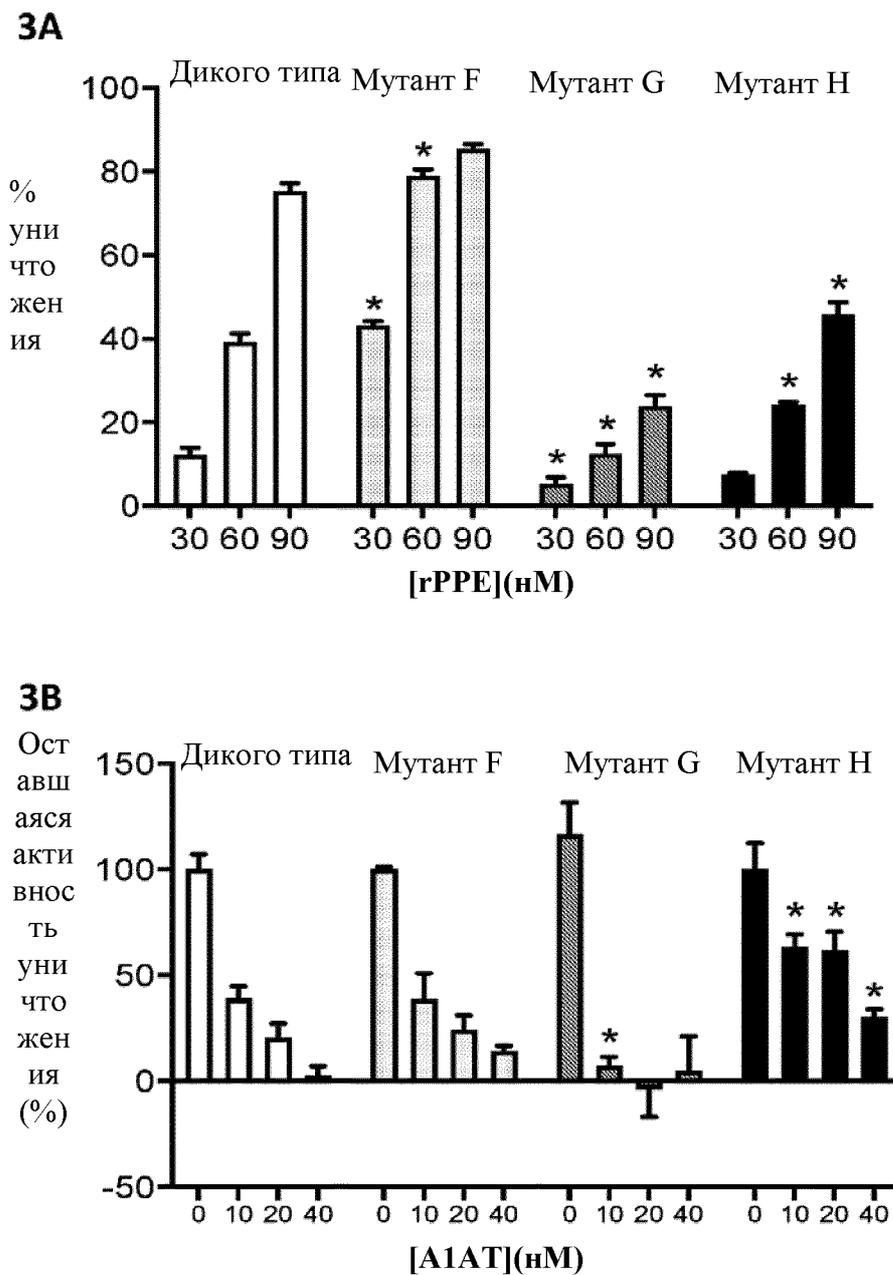
Фиг. 1А - 1В



Фиг. 1C - 1D



Фиг. 2А - 2В



Фиг. 3А - 3В