



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(52) СПК

A61K 38/43 (2020.05); C07K 16/00 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2018115781, 31.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.08.2016

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

02.11.2015 US 62/249,907;

24.02.2016 US PCT/US2016/019242

(43) Дата публикации заявки: 04.12.2019 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 27.10.2020

(15) Информация о коррекции:

Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:

18.06.2021 Бюл. № 17

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.06.2018

(86) Заявка РСТ:

US 2016/049715 (31.08.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2017/078839 (11.05.2017)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, БОКС-1125

(72) Автор(ы):

ШОРТ Джей М. (US),

ЧАН Хвай Вэнь (US),

ФРЕЙ Герхард (US)

(73) Патентообладатель(и):

БИОАТЛА, ЛЛС (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20090035836 A1, 05.02.2009. US
20100260739 A1, 14.10.2010. АЛТШУЛЕР Е.П.
и др. Получение рекомбинантных антител и
способы увеличения их аффинности, Успехи
биологической химии, т.50, 2010, стр.203-258.

(54) УСЛОВНО АКТИВНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ получения из родительского антитела или фрагмента антитела, связывающегося с антигеном, антитела или фрагмента антитела, обладающего зависящей от условий активностью связывания с антигеном, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит по меньшей мере три CDR родительского антитела, обеспечивающие способность распознавать и связывать антиген,

а также содержащие мутацию относительно родительского антитела, причем указанная активность связывания измерена в анализах, проведенных при первом и втором значениях указанного условия, причем указанная зависящая от условий активностью связывания зависит и от первого, и от второго значений условия, при которых измеряют активность, а также зависит от концентрации соединения или иона, имеющего молекулярную массу менее 100 а.е.м., выбранного

из бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфата, сульфида водорода, аммония, сульфида натрия и любой их комбинации. Изобретение позволяет

эффективно получать антитела. 11 з.п. ф-лы, 9 ил., 4 табл., 15 пр.

RU 2 735 023 C 9

RU 2 735 023 C 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(52) CPC

A61K 38/43 (2020.05); C07K 16/00 (2020.05)

(21)(22) Application: **2018115781, 31.08.2016**

(24) Effective date for property rights:
31.08.2016

Priority:

(30) Convention priority:
02.11.2015 US 62/249,907;
24.02.2016 US PCT/US2016/019242

(43) Application published: **04.12.2019 Bull. № 34**

(45) Date of publication: **27.10.2020**

(15) Correction information:
Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:
18.06.2021 Bull. № 17

(85) Commencement of national phase: **04.06.2018**

(86) PCT application:
US 2016/049715 (31.08.2016)

(87) PCT publication:
WO 2017/078839 (11.05.2017)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOKS-1125

(72) Inventor(s):

SHORT Dzhej M. (US),
CHAN Khvaj Ven (US),
FREJ Gerkhard (US)

(73) Proprietor(s):

BIOATLA, LLS (US)

(54) **CONDITIONALLY ACTIVE POLYPEPTIDES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention represents a method for obtaining from a parental antibody or antigen-binding antibody fragment, an antibody or antibody fragment, having a condition-dependent binding activity with an antigen, wherein said antibody or antibody fragment comprises at least three CDRs of the parent antibody, providing the ability to recognize and bind the antigen, as well as containing a mutation relative to the parent antibody, wherein said binding activity is measured in the analyzes, conducted at first and second values of

said condition, wherein said condition-dependent binding activity depends on both first and second conditions values, at which activity is measured, and also depends on concentration of compound or ion, having molecular weight less than 100 amu, selected from bicarbonate, acetate, lactate, bisulphate, hydrogen sulphide, ammonium, sodium sulphide and any combination thereof.

EFFECT: invention enables efficient production of antibodies.

12 cl, 9 dwg, 4 tbl, 15 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[1] Данное описание относится к области обеспечения улучшенных полипептидов с желаемыми активностями. Конкретно, данное описание относится к способу получения условно активных полипептидов из родительского полипептида, причем условно активные полипептиды являются более активными при одном условии, чем при другом, в присутствии конкретного соединения или ионной молекулы.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Существует значительный объем литературы, описывающий способы эволюционирования белков для получения различных характеристик, в частности, для того, чтобы ферменты или антитела являлись активными или стабильными при различных условиях. Например, была осуществлена эволюция ферментов, чтобы сделать их стабильными при более высоких температурах. В ситуациях, когда происходит улучшение ферментативной активности при более высокой температуре, значительную часть улучшения можно объяснить более высокой кинетической активностью, которую обычно описывают по правилу Q10, согласно которому предполагается, что в случае фермента скорость обмена удваивается при каждом повышении на 10 градусов Цельсия.

[3] Кроме того, существуют природные мутации, дестабилизирующие белки в их нормальных условиях функционирования, тем самым снижая активность белка в нормальных условиях функционирования. Например, известны температурные мутанты, которые являются активными при более низкой температуре, но, как правило, их активность снижена по сравнению с белками дикого типа, из которых они были получены.

[4] Желательно получить пептиды, которые являются условно активными (активными в зависимости от условий), например, менее активными или практически не активными при одном условии и активными при другом. Также желательно получить пептиды, которые активируются или инактивируются в определенных внешних условиях, либо которые активируются или инактивируются со временем. Помимо температуры, другие условия, на которые может быть направлено эволюционирование полипептидов или улучшение их условной активности, включают pH, осмотическое давление, осмоляльность, окислительный стресс и концентрацию электролитов. Помимо активности полипептидов, в ходе эволюции часто желательно улучшить другие свойства, которые включают химическую устойчивость и устойчивость к протеолизу.

[5] Ранее было описано множество стратегий эволюционирования белков. Например, в публикации US 2005/0100985 раскрыт быстрый и облегченный способ получения ряда мутантных полинуклеотидов из родительского полинуклеотида-матрицы посредством замены каждого положения исходного кодона в полинуклеотиде-матрице кодонами, кодирующими 20 природных аминокислот. Этот способ называют просто насыщающим мутагенезом («simply saturation mutagenesis»), и его можно применять в комбинации с другими процессами мутагенеза, например, процессом, в котором два или более родственных полинуклеотидов вводят в подходящую клетку-хозяин так, чтобы гибридный полинуклеотид нарабатывался в результате рекомбинации и восстановительной реассортации.

[6] Giver et al. ("Directed evolution of a thermostable esterase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95, pp. 12809-12813 (1998)) применяли эволюцию in vitro для исследования взаимоотношения между стабильностью и активностью в мезофильной эстеразе. Шесть поколений случайного мутагенеза, рекомбинации и скрининга в значительной степени стабилизировали п-нитробензилэстеразу *Bacillus subtilis* (повышение Tm на >14°C) без нарушения ее каталитической активности при более низких температурах. В этом

исследовании было установлено, что мутации, повышающие термостабильность с сохранением низкотемпературной активности, были весьма редкими. Улучшение одного свойства посредством накопления замен аминокислот, как правило, сказывалось на другом свойстве, вне зависимости от того, связаны ли два свойства обратной

5 корреляцией или не коррелируют вовсе.

[7] Для эволюционирования родительского полипептида, которое позволяет сделать его неактивным или практически не активным (менее 50%, 30% или 10% активности и, в особенности, 1% активности) в его обычных условиях функционирования при сохранении активности, равной или повышенной по сравнению с его активностью, в

10 абберрантных условиях, может потребоваться, чтобы дестабилизирующая мутация или мутации существовали совместно с увеличивающей активность мутацией или мутациями, которые не противодействуют дестабилизирующему эффекту. Ожидается, что дестабилизирующая мутация или мутации будут снижать активность полипептида в большей степени, чем эффекты, предсказанные стандартными правилами, такими как

15 Q10, соответственно, возможность получить путем эволюционирования полипептиды, которые эффективно функционируют, например, в абберрантных условиях, и в то же время являются менее активными или инактивированными при нормальном для них условии функционирования, позволяет получить условно активные полипептиды.

[8] Таким образом, условно активные полипептиды характеризуются повышением

20 активности при абберрантном условии по сравнению с родительским белком и снижением активности при нормальном физиологическом условии по сравнению с родительским белком. При применении в качестве терапевтических белков условно активные полипептиды, таким образом, предпочтительно действуют в местах, в которых присутствует абберрантное условие, таких как микроокружение опухоли. В результате

25 этого предпочтительного действия условно активные полипептиды потенциально окажут меньше вреда нормальным тканям/органам, в которых присутствует нормальное физиологическое условие, тем самым вызывая меньше побочных эффектов. Это обеспечит более длительные варианты лечения с применением условно активных полипептидов или больших доз условно активных полипептидов, что приведет к большей

30 эффективности терапии.

[9] В публикациях WO 2010/104821 и WO 2011/009058 раскрыты способы эволюционирования и скрининга условно активных белков.

[10] Сохраняется потребность в условно активных полипептидах, обладающих более высокой активностью и/или селективностью в конкретных окружениях и/или при

35 конкретных условиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[11] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к неприродному полипептиду или выделенному полипептиду, который характеризуется отношением активности по меньшей мере 1,3 в анализе при первом рН в присутствии

40 по меньшей мере одной молекулы с молекулярной массой менее 900 а.е.м. и рКа, которая отличается на до 0,5, 1,2 или 4 единицы от указанного первого рН, к активности в анализе при втором рН в присутствии той же по меньшей мере одной молекулы.

[12] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к неприродному полипептиду или выделенному полипептиду, который характеризуется отношением активности по меньшей мере 1,3 в анализе при первом рН в присутствии

45 по меньшей мере одной молекулы с молекулярной массой менее 900 а.е.м., к активности в анализе при втором рН в присутствии той же по меньшей мере одной молекулы, причем указанная молекула имеет рКа между указанным первым рН и указанным

вторым рН.

[13] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к неприродному полипептиду или выделенному полипептиду, который характеризуется отношением активности по меньшей мере 1,3 в анализе при первом рН в присутствии молекулы, которая выбрана из гистидина, гистамина, гидрогенизированного аденозиндифосфата, гидрогенизированного аденозинтрифосфата, цитрата, бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфиды, сульфиды водорода, аммония, дигидрофосфата и любой комбинации указанных молекул, к активности в анализе при втором рН в присутствии той же молекулы.

[14] Полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может характеризоваться отношением активности в анализе при первом рН к активности в анализе при втором рН по меньшей мере 1,5, или по меньшей мере 1,7, или по меньшей мере 2,0, или по меньшей мере 3,0, или по меньшей мере 4,0, или по меньшей мере 6,0, или по меньшей мере 8,0, или по меньшей мере 10,0, или по меньшей мере 20,0, или по меньшей мере 40,0, или по меньшей мере 60,0, или по меньшей мере 100,0. Полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации можно анализировать при первом рН, который представляет собой кислый рН, и при втором рН, который представляет собой щелочной рН или нейтральный рН. Второй рН может представлять собой нормальный физиологический рН, который находится в нормальном диапазоне физиологического условия в участке введения полипептида субъекту либо в ткани или органе в участке действия полипептида у субъекта, и первый рН может представлять собой аберрантный рН, который отличается от нормального диапазона физиологического условия в участке введения полипептида либо в ткани или органе в участке действия полипептида.

[15] Первый рН может находиться в диапазоне 5,5-7,2 или в диапазоне 6,2-6,8. Второй рН может находиться в диапазоне 7,2-7,6. Первый рН может составлять приблизительно 6,0, и второй рН может составлять приблизительно 7,4.

[16] Полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может представлять собой неприродный мутантный полипептид, образованный в результате эволюционирования из родительского полипептида. Мутантный полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может быть получен из родительского полипептида дикого типа, включая неприродный полипептид. Мутантный полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может содержать по меньшей мере одну замену аминокислоты по сравнению с родительским полипептидом.

Мутантный полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может характеризоваться более высокой долей заряженных остатков аминокислот, чем родительский полипептид.

[17] Полипептид или мутантный полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может представлять собой белок или фрагмент белка. Полипептид или мутантный полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может быть выбран из антитела, одноцепочечного антитела и фрагмента антитела, и активность представляет собой активность связывания с антигеном. Полипептид или мутантный полипептид может представлять собой Fc-область антитела. Полипептид или мутантный полипептид может представлять собой фермент, и активность может представлять собой ферментативную активность. Полипептид или мутантный полипептид может быть выбран из рецептора, регуляторного белка, растворимого белка, цитокина и фрагмента рецептора, регуляторного белка, растворимого белка или цитокина.

[18] Молекула согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может представлять собой сульфид водорода, бикарбонат или бисульфид. Молекула согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может характеризоваться рКа более 6,2.

5 [19] Полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации может содержать два функциональных домена, и активность представляет собой активность одного из двух функциональных доменов. Оба из двух функциональных доменов могут обладать рН-зависимой активностью. Полипептид может представлять собой биспецифичное антитело.

10 [20] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации можно применять для лечения солидных опухолей, воспаленных суставов или заболеваний или нарушений функции головного мозга.

15 [21] Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способу лечения солидных опухолей, воспаленных суставов или заболеваний или нарушений функции головного мозга, причем указанный способ включает этап введения полипептида согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации. Полипептид можно вводить в качестве части химерного антигенного рецептора для Т-клеток, содержащего полипептид, или связанным с наночастицей, или в качестве конъюгата

20 антитело-лекарственное средство, содержащего полипептид.
[22] Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору для Т-клеток, содержащему полипептид. Согласно каждому из вышеуказанных вариантов реализации настоящего изобретения полипептид может быть связан с наночастицей.

25 [23] Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему полипептид.

[24] Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую условно активный биологический белок и фармацевтически приемлемый носитель.

30 [25] Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения условно активного полипептида из родительского полипептида, причем указанный способ включает следующие этапы:

(i) эволюционирование родительского полипептида посредством мутирования по меньшей мере одной области за пределами его активного сайта с получением одного

35 или нескольких мутантных полипептидов;
(ii) проведение первого анализа одного или нескольких полипептидов и родительского полипептида при нормальном физиологическом условии для измерения активности активного сайта при нормальном физиологическом условии и второго анализа при абберрантном условии для измерения активности активного сайта при абберрантном

40 условии, причем нормальное физиологическое условие и абберрантное условие представляют собой одно и то же условие, характеризующееся различными значениями;
и
(iii) отбор из одного или нескольких мутантных полипептидов условно активного полипептида, который демонстрирует как (а) снижение активности по сравнению с той

45 же активностью родительского полипептида в первом анализе, так и (b) повышение активности по сравнению с той же активностью родительского полипептида во втором анализе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[26] На ФИГ. 1 представлены условно активные антитела, полученные в примере 9, и их селективность при рН 6,0 по сравнению с рН 7,4.

[27] На ФИГ. 2 представлена активность связывания условно активных антител с антигеном, которую анализировали в различных буферных растворах.

[28] На ФИГ. 3 представлены эффекты изменения состава буфера Кребса в отношении активности связывания условно активного антитела.

[29] На ФИГ. 4 представлено, что активности связывания трех различных условно активных антител зависели от присутствия и концентрации бикарбоната при рН 7,4, как описано в примере 12.

[30] ФИГ. 5 представляет собой диаграмму, демонстрирующую структуру химерного антигенного рецептора (ХАР).

[31] ФИГ. 6 представляет собой диаграмму, демонстрирующую образование солевых мостиков в дезоксигемоглобине, где три остатка аминокислот образуют два солевых мостика, которые стабилизируют четвертичную структуру дезоксигемоглобина, приводя к более низкой аффинности к кислороду.

[32] На ФИГ. 7 представлены активности условно активных антител против Ror2 в различных буферных растворах.

[33] На ФИГ. 8 представлены активности условно активных антител против Axl в различных буферных растворах.

[34] На ФИГ. 9 представлена активность условно активных антител против Axl, которую исследовали с применением растворов для анализа с 10 мМ бисульфид-иона.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[35] Для облегчения понимания представленных в настоящем документе примеров в настоящем документе будут определены некоторые часто встречающиеся способы и/или термины. Определения следующих терминов включены посредством ссылки из патента США №8,709,755 В2: «средство», «нечеткое требование к основанию», «аминокислота», «амплификация», «химерное свойство», «когнатный», «окно сравнения», «консервативные замены аминокислот», «соответствует», «эффективный для разложения», «рамка считывания определенной последовательности», «структура определенной последовательности», «расщепление», «направленное лигирование», «шаффлинг ДНК», «лекарственное средство» или «молекула лекарственного средства», «эффективное количество», «эпитоп», «фермент», «эволюция» или «эволюционирование», «фрагмент» или «производное», или «аналог», «полный диапазон замен единичной аминокислоты», «ген», «генетическая нестабильность», «гетерологичный», «гомологичный» или «гомеологичный», «промышленные применения», «идентичный» или «идентичность», «области идентичности», «выделенный», «выделенная нуклеиновая кислота», «лиганд», «лигирование», «линкер» или «спейсер», «микроокружение», «молекулярное свойство, подлежащее эволюционированию», «мутации», «N,N,G/T», «нормальные физиологические условия» или «условия функционирования дикого типа», «молекула нуклеиновой кислоты», «молекула нуклеиновой кислоты», «последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая» или «последовательность ДНК, кодирующая» или «нуклеотидная последовательность, кодирующая», «нуклеиновая кислота, кодирующая фермент (белок)» или «ДНК, кодирующая фермент (белок)», или «полинуклеотид, кодирующий фермент (белок)», «специфичный вид молекулы нуклеиновой кислоты», «сборка рабочего образца нуклеиновой кислоты в библиотеку нуклеиновых кислот», «библиотека нуклеиновых кислот», «конструкция», «олигонуклеотид» (или синонимически «олиго»), «гомологичный», «функционально связанный», «набор родительских полинуклеотидов», «пациент» или «субъект»,

«физиологические условия», «популяция», «про-форма», «псевдослучайный», «квазиповторяющиеся единицы», «библиотека случайных пептидов», «последовательность случайного пептида», «рецептор», «рекомбинантные» ферменты, «синтетические» ферменты, «родственные полинуклеотиды», «восстановительная реассортация», «эталонная последовательность», «индекс повторения (repetitive index, RI)», «сайт рестрикции», «отбираемый полинуклеотид», «идентичность последовательности», «подобие», «специфично связанный», «специфичная гибридизация», «специфичный полинуклеотид», «жесткие условия гибридизации», «по существу идентичный», «по существу чистый фермент», «по существу чистый», «лечение», «вариабельный сегмент» и «вариант».

[36] В настоящем документе применительно к измеряемой величине термин «приблизительно» относится к нормальной вариации данной измеряемой величины, которую будет ожидать специалист в данной области техники, производящий измерения и принимающий меры соразмерно с задачей измерения и точностью применяемого измерительного оборудования. Если не указано обратное, термин «приблизительно» относится к вариации, равной +/- 10% от приведенного значения.

[37] В настоящем документе термин «активность» относится к любой функции, которую может выполнять белок, включая катализ реакций и связывание с партнером. Для ферментов активность может представлять собой ферментативную активность. Для антител активность может представлять собой активность связывания (т.е. связывающую активность) между антителом и его антигеном или антигенами. Для рецепторов или лигандов активность может представлять собой активность связывания между рецептором и его лигандом.

[38] Термин «антитело» в настоящем документе относится к интактным молекулам иммуноглобулина, а также к фрагментам молекул иммуноглобулина, таким как фрагменты Fab, Fab', (Fab')₂, Fv и ОЦА (одноцепочечные антитела), которые способны к связыванию с эпитопом антигена. Данные фрагменты антитела, которые сохраняют некоторую способность к селективному связыванию с антигеном (например, полипептидным антигеном) антитела, из которого они получены, могут быть сконструированы с применением способов, хорошо известных в данной области техники (см., например, публикацию Harlow and Lane, выше) и описанных далее, как указано ниже. Антитела можно применять для выделения препаративных количеств антигена методом иммуноаффинной хроматографии. Различные другие варианты применения таких антител заключаются в диагностике и/или определении стадии заболевания (например, неоплазии) и в терапевтическом применении для лечения заболевания, такого как, например: неоплазия, аутоиммунное заболевание, СПИД, сердечно-сосудистое заболевание, инфекции и т.п. Химерные, подобные человеческим, гуманизированные или полностью человеческие антитела являются особенно подходящими для введения пациентам-людям.

[39] Fab-фрагмент состоит из моновалентного антигенсвязывающего фрагмента молекулы антитела и может быть получен посредством расщепления целой молекулы антитела ферментом папаином с получением фрагмента, состоящего из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи.

[40] Fab'-фрагмент молекулы антитела можно получить посредством обработки целой молекулы антитела пепсином с последующим восстановлением с получением молекулы, состоящей из интактной легкой цепи и части тяжелой цепи. Два Fab'-фрагмента получают из каждой молекулы антитела, обработанной таким образом.

[41] (Fab')₂-фрагмент антитела можно получить посредством обработки целой

молекулы антитела ферментом пепсином без последующего восстановления. (Fab')₂-фрагмент представляет собой димер двух Fab'-фрагментов, удерживаемых вместе двумя дисульфидными связями.

[42] Fv-фрагмент определяют как генноинженерный фрагмент, содержащий 5
вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, экспрессированные в виде двух цепей.

[43] Одноцепочечное антитело («ОЦА» (SCA) или scFv) представляет собой 10
генноинженерную одноцепочечную молекулу, содержащую вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, соединенные подходящим подвижным полипептидным линкером, которые могут содержать дополнительные 15
аминокислотные последовательности на amino- и/или карбоксильном конце. Например, одноцепочечное антитело может содержать связывающий сегмент для присоединения к кодирующему полинуклеотиду. Функциональное одноцепочечное антитело, как правило, содержит достаточную часть вариабельной области легкой цепи и достаточную 20
область вариабельной области тяжелой цепи для сохранения свойства полноразмерного антитела к связыванию со специфичной молекулой-мишенью или эпитопом.

[44] Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность» или «АЗКЦ» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый иммуноглобулин, связанный с 25
Fc-рецепторами (FcR), присутствует на определенных цитотоксических клетках (например, клетках-природных киллерах (Natural Killer, NK), нейтрофилах и макрофагах), что позволяет данным цитотоксическим эффекторным клеткам специфично связываться с антигенсодержащей клеткой-мишенью и впоследствии вызывать гибель клетки-мишени при помощи цитотоксинов. Лиганд-специфичные высокоаффинные антитела IgG, 30
направленные к поверхности клеток-мишеней, стимулируют цитотоксические клетки и являются необходимыми для такой гибели. Лизис клетки-мишени является 35
внеклеточным, требует непосредственного контакта между клетками и не включает комплемент.

[45] Можно исследовать способность любого конкретного антитела опосредовать 40
лизис клетки-мишени посредством АЗКЦ. Для оценки активности АЗКЦ представляющее интерес антитело добавляют к клеткам-мишеням, экспонирующим 45
лиганд-мишень, в комбинации с иммунными эффекторными клетками, которые можно активировать при помощи комплексов антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз, как правило, обнаруживают по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных 50
внутриклеточных белков) из лизированных клеток. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеары периферической крови (МКПК) и клетки-природные киллеры (NK). Конкретные примеры исследований АЗКЦ *in vitro* описаны в публикациях Bruggemann et al, 1987, J Exp Med, vol. 166, page 1351; Wilkinson et al, 2001, J Immunol. Methods, vol. 258, page 183; Patel et al, 1995 J. Immunol. Methods, vol. 184, page 55
29. В качестве альтернативы или дополнительно, активность АЗКЦ представляющего интерес антитела можно оценить *in vivo*, например, в модели на животных, такой как модель, раскрытая в публикации Clynes et al, 1998, PNAS USA, vol. 95, p. 652.

[46] Термин «антиген» или «АГ» в настоящем документе определен как молекула, 60
способная запускать иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать наработку антитела или активацию специфичных иммунологически компетентных клеток, или 65
оба данных события. Специалист в данной области техники понимает, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Совершенно очевидно, что антиген может быть создан, синтезирован

или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, без ограничения, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

[47] Термин «антисмысловая РНК» в настоящем документе означает молекулу РНК, способную образовывать дуплекс со второй молекулой РНК за счет комплементарности или частичной комплементарности со второй молекулой РНК. Антисмысловая молекула РНК может быть комплементарной транскрибируемой или нетранскрибируемой области второй молекулы РНК. Антисмысловая РНК не должна быть полностью комплементарной второй молекуле РНК. Антисмысловая РНК может характеризоваться или может не характеризоваться такой же длиной, что и вторая молекула РНК; антисмысловая молекула РНК может быть длиннее или короче, чем вторая молекула РНК. Если вторая молекула РНК представляет собой мРНК, связывание антисмысловой РНК полностью или частично предотвратит трансляцию мРНК в функциональный белковый продукт.

[48] Термин «биоаналог» или «биоподобный лекарственный препарат» используется в соответствии с рабочим определением, обнародованным Управлением США по контролю над качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (U.S. Food and Drug Administration, FDA), которое определяет биоаналог как препарат, который является «в высокой степени подобным» эталонному препарату (несмотря на незначительные различия в неактивных с клинической точки зрения компонентах). На практике клинически значимые различия между эталонным препаратом и препаратом-биоаналогом в отношении безопасности, чистоты и активности могут отсутствовать (Закон о службе здравоохранения (Public Health Service, PHS), §262). Биоаналог также может представлять собой продукт, который соответствует одному или нескольким руководствам, принятым 30 мая 2012 года Комитетом по лекарственным препаратам для медицинского применения (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) Европейского медицинского агентства и опубликованным Европейским союзом как «Руководство в отношении подобных биологических медицинских продуктов, содержащих моноклональные антитела -доклинические и клинические аспекты» («Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies-non-clinical and clinical issues» (ссылка на документ EMA/CHMP/BMWP/403543/2010)). Например, «биоаналог антитела» означает следующую версию инновационного антитела (эталонного антитела), как правило, полученную другой компанией. Различия между биоаналогом антитела и эталонным антителом могут включать посттрансляционную модификацию, например, посредством присоединения к антителу других биохимических групп, таких как фосфат, различные липиды и углеводы; посредством протеолитического расщепления после трансляции; посредством изменения химической природы аминокислоты (например, формилирования); или посредством множества других механизмов. Другие посттрансляционные модификации могут представлять собой последствие операций процесса производства - например, гликирование может возникать при воздействии на препарат редуцирующих сахаров. В некоторых случаях условия хранения могут допускать возникновение определенных путей деградации, таких как окисление, деамидирование или агрегация. Все из данных родственных препарату вариантов могут быть включены в биоаналог антитела.

[49] Термины «рак» и «раковые» относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток/пролиферацией. «Опухоль» включает одну или несколько раковых клеток. Примеры рака включают, без ограничения,

карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретные примеры таких типов рака включают плоскоклеточный рак (например, плоскоклеточный рак эпителия), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого («НМРЛ»), аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоклеточный рак, гастрический рак или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишок, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почек или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному анального канала, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

[50] Термин «химерный антигенный рецептор», или «ХАР» в настоящем документе означает сконструированный рецептор, который переносит антигенспецифичность на цитотоксичную клетку, например, на Т-клетки, клетки NK и макрофаги. ХАР согласно настоящему изобретению могут включать по меньшей мере одну антиген-специфичную нацеливающую область (antigen specific targeting region, ASTR), внеклеточный спейсерный домен (extracellular spacer domain, ESD), трансмембранный домен (transmembrane domain, TM), один или несколько костимуляторных доменов (co-stimulatory domains, CSD) и домен внутриклеточной передачи сигналов (intracellular signaling domain, ISD). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ESD и/или CSD являются необязательными. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ASTR является биспецифичным и может распознавать два различных антигена или эпитопа. После того как ASTR специфично связывается с антигеном-мишенью, ISD активирует внутриклеточную передачу сигналов цитотоксической клетки. Например, ISD может перенаправлять специфичность и цитотоксичность Т-клетки в отношении выбранной мишени способом, не рестриктированным по МНС, на основании антигенсвязывающих свойств ХАР. Не рестриктированное по МНС распознавание антигена обеспечивает цитотоксическим клеткам, экспрессирующим ХАР, способностью распознавать антиген вне зависимости от процессинга антигена, тем самым обходя основной механизм избегания опухолью контроля со стороны иммунной системы. Более того, при экспрессии в Т-клетках ХАР преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (T cell receptor, TCR).

[51] Термин «условно активный полипептид» относится к варианту или мутанту родительского полипептида, который является более активным, чем родительский полипептид, при по меньшей мере одном условии и менее активным, чем родительский полипептид, при втором условии, или относится к варианту или мутанту родительского полипептида, причем вариант или мутантный полипептид является по меньшей мере в 1,3 раза более активным при первом условии, чем при втором условии. Данный условно активный полипептид может демонстрировать активность в одном или нескольких выбранных месторасположениях тела и/или может проявлять повышенную или пониженную активность в другом месторасположении тела. Например, согласно одному аспекту эволюционировавший условно активный биологический белок является практически не активным при температуре тела, однако является активным при более низких температурах. Условно активные полипептиды включают условно активные белки, фрагменты белков, антитела, фрагменты антител, ферменты, фрагменты ферментов, рецепторы и фрагменты рецепторов, цитокины и их фрагменты, гормоны и их фрагменты, лиганды и их фрагменты, регуляторные белки и их фрагменты, факторы

роста и их фрагменты, а также белки, включая белок стресса, белок, связанный с vault, нейронный белок, белок пищеварительного тракта, фактор роста, митохондриальный белок, цитозольный белок, животный белок, структурный белок, растительный белок и фрагменты любого из данных белков. Каждый из условно активных полипептидов, описанных в настоящем документе, предпочтительно, является условно активным биологическим полипептидом.

[52] Термин «цитокин» или «цитокины» в настоящем документе означает общий класс биологических молекул, которые оказывают эффект/влияют на клетки иммунной системы. Данное определение предназначено для включения, без ограничения, тех биологических молекул, которые действуют местно или в других областях за пределами участка секреции посредством кровообращения для регулирования или модулирования иммунного ответа индивидуума. Иллюстративные цитокины включают, без ограничения, интерферон альфа (ИФН- α), интерферон бета (ИФН- β) и интерферон гамма (ИФН- γ), интерлейкины (например, с ИЛ-1 по ИЛ-29, в частности, ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18), факторы некроза опухоли (например, ФНО-альфа и ФНО-бета), эритропоэтин (ЭПО), МРЗ α , белок хемотаксиса моноцитов (monocyte chemotactic protein, MCP)-1, молекулу внутриклеточной адгезии (intracellular adhesion molecule, ICAM), колониестимулирующий фактор макрофагов (М-КСФ), колониестимулирующий фактор гранулоцитов (Г-КСФ) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (ГМ-КСФ).

[53] В настоящем документе термин «электролит» применяют для определения минерала, который несет заряд, в крови или в других жидкостях организма. Например, согласно одному аспекту нормальное физиологическое условие и aberrantное условие могут представлять собой различные значения «концентрации электролита».

Иллюстративные электролиты включают, без ограничения, ионизированный кальций, натрий, калий, магний, хлорид, цитрат, лактат, бикарбонат и фосфат.

[54] Термин «полноразмерное антитело» означает антитело, которое содержит антигенсвязывающую вариабельную область (V_H или V_L), а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут являться константными доменами нативной последовательности (например, константными доменами нативной последовательности человека) или вариантами их аминокислотной последовательности. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей полноразмерные антитела могут быть отнесены к различным «классам». Существует пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называют альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно.

[55] Термин «фактор роста» в настоящем документе означает полипептидную молекулу, которая способна осуществлять дифференциацию клеток. Примеры факторов роста включают, без ограничения, эпидермальный фактор роста (ЭФР), трансформирующий фактор роста альфа (ТФР α), трансформирующий фактор роста бета (ТФР β), фактор роста эндотелиальных клеток (ФРЭК) человека, колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (ГМ-КСФ), морфогенетический белок кости (МБК), фактор роста нервов (ФРН), фактор роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ), фактор роста фибробластов (ФРФ), инсулиноподобный фактор роста (ИФР), хрящевой морфогенетический белок (ХМБ) и фактор роста тромбоцитов (ФРТ).

[56] Термин «гормоны» в настоящем документе означает вещество, часто обнаруживаемое как медиатор, которое, как правило, высвобождается клеткой или железой в одной части организма, чтобы выступать в качестве мессенджера в других частях организма. Иллюстративные гормоны включают эндокринные гормоны, которые высвобождаются непосредственно в сосудистое русло, и экзокринные гормоны (или эктогормоны), которые секретируются непосредственно в проток, а из протока поступают в сосудистое русло или переносятся от клетки к клетке посредством диффузии в процессе, известном как паракринная передача сигналов. Гормоны позвоночных можно разделить на три химических класса: пептидные гормоны, липидные и полученные из фосфолипидов гормоны и моноамины. Пептидные гормоны состоят из полипептидных цепей. Примеры пептидных гормонов включают инсулин и гормоны роста. Липидные и полученные из фосфолипидов гормоны получены из липидов, таких как линолевая кислота и арахидоновая кислота и фосфолипиды. Основными классами являются стероидные гормоны, которые получают из холестерина и эйкозаноидов. Примерами стероидных гормонов являются тестостерон и кортизол. Моноамины получают из ароматических веществ, таких как фенилаланин, тирозин и триптофан, под действием ферментов декарбоксилаз ароматических аминокислот. Примерами моноаминов являются тироксин и адреналин.

[57] Термин «иммуномодулятор» в настоящем документе означает средство, действие которого на иммунную систему приводит к немедленному или отсроченному усилению или снижению активности по меньшей мере одного пути, вовлеченного в иммунный ответ. Такой ответ может быть природным или искусственно запускаемым как часть врожденной или адаптивной иммунной системы, или может представлять собой оба ответа. Примеры иммуномодуляторов включают цитокины, факторы роста стволовых клеток, лимфотоксины, такие как фактор некроза опухоли (ФНО), и гематопоэтические факторы, такие как интерлейкины (например, интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-21), колониестимулирующие факторы (например, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (Г-КСФ) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ)), интерфероны (например, интерфероны- α , β и γ), фактор роста стволовых клеток, обозначенный как «S1 фактор», эритропоэтин и тромбопоэтин. Примеры подходящих веществ-иммуномодуляторов включают ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-21, интерфероны, ФНО (например, ФНО- α) и т.п.

[58] «Индивидуум» или «субъект» является млекопитающим. Млекопитающие включают, без ограничения, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и нечеловекообразных приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс).

[59] Термин «библиотека» в настоящем документе относится к коллекции белков в одном пуле. Библиотеку можно получить с применением технологии рекомбинантной ДНК. Например, коллекцию кДНК или любых других кодирующих белок ДНК можно ввести в вектор экспрессии для получения библиотеки белка. Коллекцию кДНК или кодирующих белок ДНК также можно ввести в фаговый геном для создания библиотеки бактериофагового дисплея белков дикого типа. Коллекцию кДНК можно получить из выбранной популяции клеток или образца ткани, например, при помощи способов, раскрытых в руководстве Sambrook et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Коллекции кДНК из выбранных типов клеток также коммерчески доступны от таких поставщиков, как Stratagene[®]. В настоящем документе библиотека белков дикого типа не является коллекцией биологических образцов.

[60] Термин «лиганд» в настоящем документе относится к молекуле, которая

распознается конкретным рецептором и специфично связывается с рецептором в одном или нескольких сайтах связывания. Примеры лигандов включают, без ограничения, агонисты и антагонисты рецепторов мембраны клетки, токсины и яды, эпитопы вирусов, гормоны, пептиды рецепторов гормонов, ферменты, субстраты ферментов, кофакторы, лекарственные средства (например, опиаты, стероиды и т.д.), лектины, сахара, полинуклеотиды, нуклеиновые кислоты, олигосахариды, белки и моноклональные антитела. Как правило, лиганд содержит две структурные части: первую часть, которая участвует в связывании лиганда с его рецептором, и вторую часть, которая не участвует в таком связывании.

[61] Термин «рецептор» в настоящем документе означает молекулу, которая обладает аффинностью к данному лиганду. Рецепторы могут представлять собой природные или синтетические молекулы. Рецепторы можно использовать в неизмененном состоянии или в виде агрегатов с другими молекулами. Рецепторы могут быть присоединены ковалентным или нековалентным способом к связывающемуся участнику либо напрямую, либо через специфическое связывающее вещество. Примеры рецепторов включают, без ограничения, антитела, включая моноклональные антитела и антисыворотку, взаимодействующие со специфичными антигенными детерминантами (например, на вирусах, клетках или других материалах), рецепторы клеточных мембран, сложные углеводы и гликопротеины, ферменты и рецепторы гормонов. Связывание лиганда с его рецептором свидетельствует об объединении лиганда и его рецепторной молекулы в результате специфичного молекулярного распознавания с образованием комплекса, который можно обнаружить посредством множества анализов связывания лиганда с рецептором, известных специалисту.

[62] Термин «микроРНК» в настоящем документе означает непроцессированный или процессированный РНК-транскрипт с гена микроРНК. Непроцессированный транскрипт гена микроРНК, как правило, содержит РНК-транскрипт длиной приблизительно 70-100 нуклеотидов. Транскрибированную микроРНК можно подвергнуть процессингу посредством расщепления РНКазой (например, Дайсер, Аргонавт или РНКазой III) с получением активной молекулы РНК, состоящей из 19-25 нуклеотидов. Данную активную молекулу РНК из 19-25 нуклеотидов также называют «процессированным» транскриптом гена микроРНК или «зрелой» микроРНК.

[63] Термин «мультиспецифичное антитело» в настоящем документе представляет собой антитело, обладающее специфичностями связывания в отношении по меньшей мере двух различных эпитопов. Иллюстративные мультиспецифичные антитела могут связываться как с BVB-R, так и с антигеном головного мозга. Мультиспецифичные антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂-биспецифичные антитела). Также подразумеваются сконструированные антитела с двумя, тремя или более (например, четырьмя) функциональными антигенсвязывающими сайтами (см., например, публикацию US 2002/0004587 A1).

[64] Термин «наночастица» в настоящем документе означает микроскопическую частицу, размер которой измеряется в нанометрах (нм), с максимальным линейным размером менее приблизительно 1000 нм, или менее приблизительно 500 нм, или менее приблизительно 200 нм, или менее приблизительно 100 нм, или менее приблизительно 50 нм. В настоящем документе линейный размер означает расстояние между любыми двумя точками на наночастице, измеренное по прямой линии. Форма наночастиц согласно настоящему изобретению может являться неправильной, продолговатой, веретенообразной, стержневидной, дисковидной, лепешкообразной, цилиндрической,

подобной форме красных кровяных клеток, сферической или по существу сферической при условии, что форма и размер частиц позволяют осуществляться взаимодействиям связывания. Наночастицы согласно настоящему изобретению, предпочтительно, изготовлены из биосовместимых материалов (полимеров или липидов).

5 [65] В настоящем документе термин «природный» применительно к объекту относится к тому факту, что объект можно обнаружить в природе. Например, последовательность полипептида или полинуклеотида, присутствующая в организме (включая вирусы), которую можно выделить из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лабораторных условиях, представляет собой природную
10 последовательность. Полипептид, вырезанный из большего полипептида, не является природным полипептидом, поскольку концевые группы вырезанного полипептида будут отличаться в вырезанной форме по сравнению с большим природным полипептидом, поскольку данные концевые группы больше не будут связаны с прилежащими полипептидами. Как правило, термин «природный» относится к объекту,
15 который присутствует у индивидуума, не страдающего от патологий (заболеваний), и, соответственно, будет типичным для указанного вида.

[66] Термины «родительский полипептид» и «родительский белок» в настоящем документе означают полипептид или белок, которые можно эволюционировать для получения условно активного полипептида или белка с применением способов согласно
20 настоящему изобретению. Белок родительского полипептида может представлять собой белок дикого типа, включая неприродный белок. Например, терапевтический полипептид или белок либо мутант или вариант полипептида или белка можно применять в качестве родительского полипептида или белка. Примеры родительских полипептидов и белков включают антитела, фрагменты антител, ферменты, фрагменты
25 ферментов, цитокины и их фрагменты, гормоны и их фрагменты, лиганды и их фрагменты, рецепторы и их фрагменты, регуляторные белки и их фрагменты, а также факторы роста и их фрагменты.

[67] Термин «рН-зависимый» в настоящем документе означает полипептид, обладающий свойством или активностью, которые являются различными при различных
30 значениях рН.

[68] Термин «полипептид» в настоящем документе относится к полимеру, в котором мономеры являются аминокислотами и соединены друг с другом пептидными или дисульфидными связями. Полипептид может представлять собой полноразмерную природную цепь аминокислот или ее фрагмент, мутант или вариант, такой как
35 выбранная область цепи аминокислот, которая представляет интерес в отношении взаимодействия связывания. Полипептид также может представлять собой синтетическую цепь аминокислот или комбинацию природной цепи аминокислот или ее фрагмента и синтетической цепи аминокислот. Фрагмент относится к аминокислотной последовательности, которая представляет собой часть полноразмерного белка, длиной,
40 как правило, от приблизительно 8 до приблизительно 500 аминокислот, предпочтительно, от приблизительно 8 до приблизительно 300 аминокислот, более предпочтительно, от приблизительно 8 до приблизительно 200 аминокислот и, даже еще более предпочтительно, от приблизительно 10 до приблизительно 50 или 100 аминокислот. Дополнительно, в состав полипептидов могут быть включены
45 аминокислоты, отличные от природных аминокислот, например, β -аланин, фенилглицин и гомоаргинин. Аминокислоты могут представлять собой либо D-, либо L-оптические изомеры. D-изомеры предпочтительны для применения в специфичном контексте, дополнительно описанном ниже. Кроме того, другие пептидомиметики также являются

подходящими, например, в линкерных последовательностях полипептидов (см. публикацию Spatola, 1983, in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids. Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p. 267). В целом, термин «белок» не предназначен для выражения какого-либо значимого отличия от термина «полипептид»,

5 кроме как для включения структур, которые содержат две или более полипептидных цепей, которые совместно удерживаются ковалентными или нековалентными связями.

[69] Термин «рекомбинантное антитело» в настоящем документе означает антитело (например, химерное, гуманизированное или антитело человека либо его антигенсвязывающий фрагмент), которое экспрессируется клеткой-хозяином,

10 содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело. Примеры «клеток-хозяев» для получения рекомбинантных антител включают: (1) клетки млекопитающих, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), COS, клетки миеломы (включая клетки Y0 и NS0), клетки почек новорожденного хомяка (BHK), клетки Hela и Vero; (2) клетки насекомых, например, sf9, sf21 и Tn5; (3) растительные клетки, например, клетки растений, принадлежащих к роду *Nicotiana* (например, *Nicotiana tabacum*); (4) клетки дрожжей, например, дрожжей, которые принадлежат к роду *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или роду *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*); (5) бактериальные клетки, например, клетки *Escherichia coli* или клетки *Bacillus subtilis* и т.д.

[70] Термин «регуляторный белок» в настоящем документе означает любой белок, который повышает или снижает активность другого полипептида или молекулы РНК; повышает или снижает численность другого полипептида или молекулы РНК; изменяет взаимодействие между другим полипептидом или молекулой РНК с другими полипептидами, молекулами ДНК или РНК либо любыми другими субстратами

25 связывания; и/или изменяет локализацию в клетке другого полипептида или молекулы РНК. Регуляторные белки, которые повышают или снижают уровни транскрипции гена, часто называют факторами транскрипции, которые оказывают эффекты в отношении областей промотора или энхансера гена. Примеры факторов транскрипции включают факторы транскрипции млекопитающих, такие как NFkB, NF1, белок, связывающий отвечающие на циклический АМФ элементы (cyclic AMP responsive element binding, CREB), MyoD1, факторы транскрипции гомеобокс, Spl, онкогены и jun, Mep-1, GATA-1, Isl-1, LFB1, NFAT, Pit-1, OCA-B, Oct-1 и Oct-2, A/a дрожжей, cErb-A, myc, mad и max, p53, mdml и другие, которые представлены в руководстве Latchman, 1998, Eukaryotic Transcription Factors, 3rd. Ed., Academic Press: New York. Также можно применять

35 производные данных или других факторов транскрипции в виде слитых белков, в которых по меньшей мере ДНК-связывающий мотив слитого белка, который обеспечивает специфичность связывания, слит с низкомолекулярным регулятором сайта связывания.

[71] Термин «малая интерферирующая РНК» или «миРНК» в настоящем документе означает РНК или РНК-подобную молекулу, которая может взаимодействовать с молекулой мРНК и вызывать разрушение молекулы мРНК, которая характеризуется гомологией последовательности с миРНК (Elbashir et al., Genes Dev, vol. 15, pp.188-200, 2001). Считают, что миРНК может быть встроена в рибонуклеопротеиновый комплекс, известный как РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex, RISC). RISC использует последовательность миРНК для идентификации молекул мРНК, которые по меньшей мере частично комплементарны встроенной цепи миРНК, а затем расщепляет данные молекулы-мишени мРНК или ингибирует их трансляцию. Типичная миРНК представляет собой двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты,

каждая цепь которой содержит от приблизительно 19 до приблизительно 28 нуклеотидов (т.е. приблизительно 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 нуклеотидов). миРНК может также представлять собой одноцепочечную РНК, хотя и менее эффективную, чем двухцепочечная миРНК. Одноцепочечная миРНК характеризуется длиной от

5 приблизительно 19 до приблизительно 49 нуклеотидов. Одноцепочечная миРНК содержит 5'-фосфат или является фосфорилированной *in situ* или *in vivo* по 5'-положению. Одноцепочечные миРНК можно синтезировать химическим способом или посредством транскрипции *in vitro* либо экспрессировать эндогенно с векторов экспрессии или кассет экспрессии. 5'-фосфатные группы можно добавить посредством киназы либо они могут

10 образоваться в результате расщепления РНК нуклеазой.

[72] Термин «малая молекула» означает молекулы или ионы, молекулярная масса которых, как правило, составляет менее 900 а.е.м., или, более предпочтительно, менее 500 а.е.м., или, более предпочтительно, менее 200 а.е.м., или, еще более предпочтительно, менее 100 а.е.м. В анализах и окружениях согласно настоящему изобретению малые

15 молекулы часто могут присутствовать в виде смеси молекулы и депротонированного иона молекулы, преимущественно, в зависимости от рН анализа или окружения.

[73] Термин «терапевтический белок» в настоящем документе означает любой белок и/или полипептид, который можно ввести млекопитающему, чтобы вызвать биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека,

20 требуемый, например, исследователем или клиницистом. Терапевтический белок может вызывать более одного биологического или медицинского ответа. Примеры терапевтических белков включают антитела, ферменты, гормоны, цитокины, регуляторные белки и их фрагменты.

[74] Термин «терапевтически эффективное количество» в настоящем документе

25 означает любое количество, которое по сравнению с соответствующим субъектом, который не получил такого количества, приводит, без ограничения, к заживлению, предотвращению или облегчению заболевания, нарушения или побочного эффекта, или к снижению скорости распространения заболевания или нарушения. Термин также включает в свой объем количества, эффективные для усиления нормальной

30 физиологической функции, а также количества, эффективные для вызова физиологической функции у пациента, которая усиливает или способствует терапевтическому эффекту второго фармацевтического средства.

[75] Термин «микроокружение опухоли» в настоящем документе означает микроокружение в солидной опухоли и вокруг солидной опухоли и поддерживающее

35 и рост и метастазирование опухолевых клеток. Микроокружение опухоли включает прилегающие кровеносные сосуды, иммунные клетки, фибробласты, другие клетки, растворимые факторы, сигнальные молекулы, внеклеточный матрикс и механические стимулы, которые могут способствовать неопластической трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина,

40 стимулируют резистентность к терапевтическим средствам и обеспечивают ниши для разрастания скрытых метастазов. Опухоль и ее прилегающее микроокружение являются тесно связанными и постоянно взаимодействуют. Опухоли могут влиять на свое микроокружение посредством высвобождения внеклеточных сигналов, которые способствуют ангиогенезу опухоли и индуцируют периферическую иммунную

45 толерантность, тогда как иммунные клетки в микроокружении могут влиять на рост и эволюцию раковых клеток. См. публикации Swartz et al. "Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy," Cancer Res, vol., 72, pages 2473-2480, 2012; Weber et al., "The tumor microenvironment," Surgical Oncology, vol. 21, pages 172-177, 2012;

Blagosklonny, "Antiangiogenic therapy and tumor progression," Cancer Cell, vol. 5, pages 13-17, 2004; Siemann, "Tumor microenvironment," Wiley, 2010; и Bagley, "The tumor microenvironment," Springer, 2010.

[76] В настоящем документе термин «дикого типа» означает, что полинуклеотид не содержит какой-либо мутации. «Белок дикого типа», «биологический белок дикого типа» могут означать белок, который может быть выделен из природы и который будет активен на уровне активности, обнаруженном в природе, и будет содержать аминокислотную последовательность, обнаруженную в природе. Термины «родительская молекула» и «белок-мишень» также включают белок дикого типа.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

А. рН-зависимые условно активные полипептиды

[77] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к условно активным полипептидам, обладающим рН-зависимой активностью в присутствии молекулы, характеризующейся рКа, которая отличается на 0,5, 1,2 или 4 единицы от рН, при котором активность является желательной. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к условно активным полипептидам, обладающим рН-зависимой активностью в присутствии молекулы, которая имеет рКа от приблизительно 4 до приблизительно 10, или от приблизительно 4,5 до приблизительно 9,5, или от приблизительно 5 до приблизительно 9, или от приблизительно 5,5 до приблизительно 8, или от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к условно активным полипептидам, обладающим рН-зависимой активностью в присутствии молекулы, которая выбрана из гистидина, гистамина, гидрогенизированного аденозиндифосфата, гидрогенизированного аденозинтрифосфата, цитрата, бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфида, сульфида водорода, аммония, дигидрофосфата и любой комбинации указанных молекул.

[78] Молекула, присутствующая в среде для анализа, которая обладает значительным влиянием на активность условно активного полипептида, как правило, представляет собой молекулу, которая имеет по меньшей мере два ионизированных состояния: незаряженное или менее заряженное состояние и заряженное или более заряженное состояние. В результате рКа молекулы, которая влияет на активность условно активного полипептида, может играть роль в определении степени влияния, которое молекула будет оказывать на конкретную активность полипептида и/или при конкретном рН.

[79] рН-зависимые условно активные полипептиды обладают большей активностью при первом рН, чем при втором, отличном рН, причем обе активности измеряют в анализе в присутствии одной или нескольких молекул, перечисленных выше. Для определения рН-зависимости условно активного полипептида одну и ту же активность полипептида анализируют в одной и той же среде анализа при двух различных значениях рН.

[80] Отношение активности при первом рН к той же активности при втором рН в той же среде анализа можно назвать селективностью рН-зависимого условно активного полипептида. рН-зависимые условно активные полипептиды характеризуются селективностью по меньшей мере приблизительно 1,3, или по меньшей мере приблизительно 1,5, или по меньшей мере приблизительно 1,7, или по меньшей мере приблизительно 2,0, или по меньшей мере приблизительно 3,0, или по меньшей мере приблизительно 4,0, или по меньшей мере приблизительно 6,0, или по меньшей мере приблизительно 8,0, или по меньшей мере приблизительно 10,0, или по меньшей мере приблизительно 20,0, или по меньшей мере приблизительно 40,0, или по меньшей мере приблизительно 60,0, или по меньшей мере приблизительно 100,0.

[81] Было установлено, что рН-зависимые условно активные полипептиды содержат увеличенное количество (или долю) заряженных остатков аминокислот по сравнению с остатками аминокислот родительского полипептида, из которого были получены условно активные полипептиды. Существует три положительно заряженных остатка аминокислот: лизин, аргинин и гистидин; и два отрицательно заряженных остатка аминокислот: аспартат и глутамат. Данные заряженные остатки аминокислот представлены в большом количестве в рН-зависимых условно активных полипептидах по сравнению с родительскими полипептидами, из которых были получены рН-зависимые условно активные полипептиды. В результате рН-зависимые условно активные полипептиды с большей вероятностью будут взаимодействовать с заряженными молекулами в среде анализа, поскольку количество заряженных остатков аминокислот увеличилось. Это, в свою очередь, влияет на активность условно активных полипептидов.

[82] Также было установлено, что рН-зависимые условно активные полипептиды, как правило, обладают различными активностями в присутствии различных молекул в среде анализа. Молекулы, которые имеют по меньшей мере два ионизированных состояния: незаряженное или менее заряженное состояние и заряженное или более заряженное состояние, могут диссоциировать в большей степени при конкретном рН в зависимости от значения рКа, таким образом, увеличивая вероятность взаимодействия с заряженными остатками аминокислот, присутствующими в условно активном полипептиде. Данный фактор можно использовать для усиления селективности и/или рН-зависимой активности условно активного полипептида.

[83] Природа заряда или зарядов на условно активном полипептиде может являться фактором, используемым для определения подходящих молекул для влияния на активность условно активного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активный полипептид может содержать больше положительно заряженных остатков аминокислот: лизина, аргинина и гистидина, по сравнению с родительским полипептидом. Таким образом, можно отобрать условно активный полипептид, чтобы он характеризовался желаемым уровнем взаимодействия с конкретной молекулой, присутствующей в окружении, в котором активность является желательной, и/или чтобы он характеризовался желаемым уровнем взаимодействия с конкретной молекулой, присутствующей в окружении, в котором сниженная активность является желательной. Аналогично, условно активный полипептид может содержать больше отрицательно заряженных остатков аминокислот: аспартата и глутамата, по сравнению с родительским полипептидом.

[84] Расположение заряженных остатков аминокислот на рН-зависимом условно активном полипептиде может также оказывать влияние на активность. Например, близость заряженных остатков аминокислот к сайту связывания условно активного полипептида можно использовать для влияния на активность полипептида.

[85] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения взаимодействие заряженных молекул окружения с условно активным полипептидом может блокировать или препятствовать активности рН-зависимого условно активного полипептида. Например, заряженные аминокислоты, взаимодействующие с заряженными молекулами окружения, могут способствовать проявлению аллостерических эффектов в отношении сайта связывания условно активного полипептида.

[86] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения возможен случай, когда взаимодействие заряженных молекул окружения с условно активным полипептидом может вызвать образование солевых мостиков между различными

группами на полипептиде, в особенности, группами, которые являются заряженными или поляризованными. Образование солевых мостиков, как известно, стабилизирует структуры полипептида (Donald, et al., "Salt Bridges: Geometrically Specific, Designable Interactions," *Proteins*, 79(3): 898-915, 2011; Hendsch, et al., "Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis," *Protein Science*, 3:211-226, 1994). Солевые мостики могут стабилизировать или фиксировать структуру белка, которая в норме подвергается постоянным незначительным структурным изменениям, называемым «дыханием» (Parak, "Proteins in action: the physics of structural fluctuations and conformational changes," *Curr Opin Struct Biol.*, 13(5):552-557, 2003). Структурное «дыхание» белка является важным для функционирования белка и его связывания с партнером, поскольку структурная флуктуация позволяет условно активному белку эффективно распознавать свой партнер и связываться с ним (Karplus, et al., "Molecular dynamics and protein functions," *PNAS*, vol. 102, pp. 6679-6685, 2015). Посредством образования солевых мостиков сайт связывания, в особенности, карман связывания, на условно активном полипептиде может стать менее доступным для его партнера, возможно, поскольку солевые мостики могут напрямую блокировать партнеру доступ к сайту связывания. Даже с солевыми мостиками, удаленными от сайта связывания, аллостерический эффект может изменить конформацию сайта связывания для ингибирования связывания. Вследствие этого, после того как солевые мостики стабилизировали (зафиксировали) структуру условно активного полипептида, полипептид может стать менее активным при связывании со своим партнером, что приведет к снижению активности.

[87] Известным примером полипептида и того, как солевые мостики стабилизируют его структуру, является гемоглобин. Структурные и химические исследования позволили установить, что за солевые мостики отвечают по меньшей мере два набора химических групп: аминоконец и боковые цепи гистидинов $\beta 146$ и $\alpha 122$, которые характеризуются значениями pK_a приблизительно $pH 7$. В дезоксигемоглобине концевая карбоксилатная группа $\beta 146$ образует солевой мостик с остатком лизина в α -субъединице другого димера $\alpha\beta$. Данное взаимодействие замыкает боковую цепь гистидина $\beta 146$ в положении, в котором она может участвовать в образовании солевого мостика с отрицательно заряженным аспаратом 94 в той же цепи при условии, что имидазольная группа остатка гистидина является протонированной (ФИГ. 6). При высоком pH боковая цепь гистидина $\beta 146$ не протонирована, и солевые мостики не образуются. Однако когда pH снижается, боковая цепь гистидина $\beta 146$ становится протонированной, между гистидином $\beta 146$ и аспаратом $\beta 94$ образуется солевой мостик, который стабилизирует четвертичную структуру дезоксигемоглобина, что приводит к большей склонности кислорода высвобождаться в активно метаболизирующих тканях (с более низким pH). Гемоглобин демонстрирует pH -зависимую активность связывания с кислородом, когда при низком pH активность связывания с кислородом снижена в связи с образованием солевых мостиков. С другой стороны, при высоком pH активность связывания с кислородом повышена в связи с отсутствием солевых мостиков.

[88] Аналогично, малые молекулы, такие как бикарбонат, могут снизить активность связывания условно активного полипептида со своим партнером посредством образования солевых мостиков в условно активных полипептидах. Например, при pH меньшем, чем его pK_a , составляющая 6,4, бикарбонат является протонированным и вследствие этого не заряженным. Незаряженный бикарбонат не способен образовывать солевые мостики и, таким образом, обладает незначительным эффектом в отношении связывания условно активного полипептида с его партнером. Следовательно, условно активный полипептид обладает высокой активностью связывания с его партнером при

низком pH. С другой стороны, при высоком pH, превышающим рКа бикарбоната, бикарбонат является ионизированным вследствие потери протона и, таким образом, становится отрицательно заряженным. Отрицательно заряженный бикарбонат будет образовывать солевые мостики между положительно заряженными группами или поляризованными группами на условно активном полипептиде для стабилизации структуры условно активного полипептида. Это заблокирует или снизит связывание условно активного полипептида с его партнером. Следовательно, условно активный полипептид обладает низкой активностью при высоком pH. Условно активный полипептид, таким образом, обладает условно активной активностью в присутствии бикарбоната с большей активностью связывания при низком pH, чем при высоком pH.

[89] Когда молекула, такая как бикарбонат, отсутствует в среде анализа, условно активный полипептид может утратить свою условную активность. Вероятно, это происходит в связи с отсутствием солевых мостиков на условно активном полипептиде для стабилизации (фиксации) структуры полипептида. Таким образом, партнер будет иметь аналогичный доступ к сайту связывания на условно активном полипептиде при любом pH, что вызовет аналогичную активность при первом pH и втором pH.

[90] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения взаимодействия между малой молекулой или ионом и условно активным полипептидом могут изменять структуру полипептида способом, который увеличивает его активность. Например, изменение структуры может улучшить аффинность связывания условно активного полипептида посредством изменения месторасположения, стерического несоответствия или энергии связывания для сайта связывания, необходимой для аффинности связывания. В таких случаях может быть желательно выбрать малые молекулы, которые связываются с условно активным полипептидом при pH, при котором активность является желательной.

[91] Следует понимать, что, хотя солевые мостики (ионные связи) являются наиболее сильным и наиболее частым способом для соединений и ионов влиять на активность условно активного полипептида, другие взаимодействия между такими соединениями и ионами и условно активным полипептидом могут также способствовать стабилизации (фиксации) структуры условно активного полипептида. Другие взаимодействия включают водородные связи, гидрофобные взаимодействия и ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

[92] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для выбора подходящего соединения или иона условно активный полипептид сравнивают с родительским полипептидом, из которого он был эволюционирован, для определения того, содержит ли условно активный полипептид большую долю отрицательно заряженных остатков аминокислот или положительно заряженных остатков аминокислот. Соединение с подходящим зарядом при втором pH, соответственно, можно затем выбрать для влияния на активность условно активного полипептида.

Например, когда условно активный полипептид содержит большую долю положительно заряженных остатков аминокислот, чем родительский полипептид, подходящая малая молекула должна, как правило, быть отрицательно заряженной при втором pH, чтобы взаимодействовать с условно активным полипептидом. С другой стороны, когда условно активный полипептид содержит большую долю отрицательно заряженных остатков аминокислот, чем родительский полипептид, подходящая малая молекула должна, как правило, быть положительно заряженной при втором pH, чтобы взаимодействовать с условно активным полипептидом.

[93] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения активность

условно активного полипептида контролируется посредством взаимодействия малой молекулы или иона с полипептидом-мишенью, который является партнером по связыванию условно активного полипептида. В данном случае те же принципы, которые обсуждаются выше, также являются применимыми, за исключением того, что целью является создание взаимодействия между малой молекулой или ионом и полипептидом-мишенью. Полипептид-мишень может представлять собой, например, антиген для условно активного антитела или лиганд для условно активного рецептора.

[94] Подходящая малая молекула может представлять собой любую неорганическую или органическую молекулу, которая переходит из незаряженного или менее заряженного состояния при первом рН к заряженному или более заряженному состоянию при втором рН. Таким образом, малая молекула должна, как правило, характеризоваться рКа между первым рН и вторым рН. Например, бикарбонат имеет рКа при 6,4. Таким образом, при более высоком рН, таком как рН 7,4, отрицательно заряженный бикарбонат будет связываться с заряженными остатками аминокислот в условно активном полипептиде и снижать активность. С другой стороны, при более низком рН, таком как рН 6,0, менее заряженный бикарбонат не будет связываться в том же количестве с условно активным полипептидом и, таким образом, обеспечит более высокую активность условно активного полипептида.

[95] Бисульфид имеет рКа 7,05. Таким образом, при более высоком рН, таком как рН 7,4, более отрицательно заряженный бисульфид будет связываться с положительно заряженными остатками аминокислот в условно активном полипептиде и снижать его активность. С другой стороны, при более низком рН, таком как рН 6,2-6,8, менее заряженный сульфид водорода/бисульфид не будет связываться на том же уровне с условно активным полипептидом и, таким образом, обеспечит более высокую активность условно активного полипептида.

[96] Малые молекулы с рКа между первым и вторым рН являются предпочтительными для применения в настоящем изобретении. Предпочтительные молекулы выбраны из бисульфида, сульфида водорода, гистидина, гистамина, цитрата, бикарбоната, ацетата и лактата. Каждая из данных малых молекул имеет рКа между 6,2 и 7,0. Дополнительно можно также применять другие малые молекулы, такие как трицин (рКа 8,05) и бицин (рКа 8,26). Другие подходящие малые молекулы можно найти в учебных пособиях с использованием принципов настоящей заявки, в таком как CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th Edition, by CRC press, 2015; Chemical Properties Handbook, McGraw-Hill Education, 1998.

[97] Концентрация малых молекул в среде анализа или окружении предпочтительно находится на уровне физиологической концентрации малых молекул у субъекта или вблизи от указанного уровня. Например, физиологическая концентрация бикарбоната (в сыворотке человека) находится в диапазоне от 15 до 30 мМ. Таким образом, концентрация бикарбоната в среде анализа может составлять от 10 мМ до 40 мМ, или от 15 мМ до 30 мМ, или от 20 мМ до 25 мМ, или приблизительно 20 мМ. Физиологическая концентрация бисульфида также является низкой. Концентрация бисульфида в среде анализа может составлять от 3 до 500 нМ, или от 5 до 200 нМ, или от 10 до 100 нМ, или от 10 до 50 нМ.

[98] В настоящем изобретении условно активные полипептиды выбирают и применяют в концентрациях, при которых нормальная физиологическая концентрация конкретной молекулы в окружении будет оказывать значительный эффект в отношении активности условно активных полипептидов в диапазоне рН, представляющем интерес. Таким образом, во многих терапевтических воздействиях низкая активность условно активного

полипептида приблизительно при рН 7,2-7,4 крови или сыворотки человека может характеризоваться преимуществом для обеспечения доставки терапевтического воздействия посредством сосудистого русла с одновременной минимизацией или предотвращением активации условно активного полипептида. В результате для таких вариантов лечения будет характеризоваться преимуществом отбор малых молекул, которые характеризуются рКа ниже рН 7,2-7,4, с целью обеспечения достаточного количества ионизации малой молекулы при рН сосудистого русла, чтобы оказывать значительный эффект в отношении активности условно активного полипептида. В то же время рКа малой молекулы должно находиться на уровне или выше рН, при котором активность условно активного полипептида является желательной, для обеспечения активации условно активного полипептида посредством протонирования малой молекулы с целью освобождения сайтов связывания на условно активном полипептиде.

[99] Малые молекулы, предпочтительно, характеризуются низкой молекулярной массой и/или относительно небольшой конформацией, чтобы обеспечить максимальный доступ в небольшие карманы на полипептиде-мишени или условно активном полипептиде посредством минимизации стерического несоответствия. По этой причине молекулярная масса малых молекул, как правило, составляет менее 900 а.е.м., или, более предпочтительно, менее 500 а.е.м., или, более предпочтительно, менее 200 а.е.м., или, еще более предпочтительно, менее 100 а.е.м. Например, сульфид водорода, бисульфид и бикарбонат все характеризуются низкими молекулярными массами и небольшими структурами, которые обеспечивают доступ в карманы на полипептиде-мишени или условно активном полипептиде, как продемонстрировано в примерах 13 и 14 ниже.

[100] Малая молекула может присутствовать в анализах или окружениях по существу в одинаковой концентрации, например, приблизительно 20 мкМ для бикарбоната. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения малая молекула может присутствовать в различных окружениях в различных концентрациях и, таким образом, может быть желательно имитировать это в анализах. Например, бисульфид характеризуется более высокой концентрацией в микроокружении опухоли, чем в сыворотке человека. Таким образом, в одном анализе можно имитировать микроокружение опухоли с кислым рН и более высокой концентрацией бисульфида, тогда как во втором анализе можно имитировать сыворотку человека с нейтральным или слабо щелочным рН и более низкой концентрацией бисульфида. Кислый рН может находиться в диапазоне от 6,0 до 6,8, тогда как нейтральный или слабощелочной рН может составлять приблизительно 7,4. Более высокая концентрация бисульфида для первого анализа может составлять 30 мкМ, тогда как более низкая концентрация бисульфида для второго буфера может составлять 10 мкМ или менее, или 5 мкМ.

[101] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активный полипептид является рН-зависимым, когда присутствуют две или более различных малых молекул, например, комбинация бикарбоната и гистидина.

[102] Когда малая молекула отсутствует, условно активные полипептиды могут утратить свою рН-зависимость. Таким образом, при отсутствии малой молекулы условно активные полипептиды могут характеризоваться аналогичной активностью между первым рН и вторым рН при отсутствии малой молекулы.

[103] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый рН представляет собой кислый рН, тогда как второй рН представляет собой щелочной или нейтральный рН. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения первый рН представляет собой щелочной рН, тогда как второй рН представляет собой

кислый или нейтральный pH. Например, первый pH может представлять собой pH в диапазоне от приблизительно 5,5 до 7,2, или от приблизительно 6,0 до 7,0, или от приблизительно 6,2 до 6,8. Второй pH может представлять собой pH в диапазоне от приблизительно 7,0 до 7,8, или от приблизительно 7,2 до 7,6.

5 [104] Условно активные полипептиды, более активные при кислом pH и менее активные при щелочном или нейтральном pH, могут нацеливаться на микроокружение опухоли, в котором pH является кислым от приблизительно 5,5 до 7,2 или от приблизительно 6,2 до 6,8.

10 [105] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения первый pH, при котором pH-зависимые полипептиды являются более активными, может представлять собой щелочной pH, составляющий, например, 7,6-7,9, такой как в синовиальной жидкости (См. публикацию Jebens et al., "On the viscosity and pH of synovial fluid and pH of blood," Journal of Bone and Joint Surgery, vol. 41 B, pp. 388-400, 1959). Второй pH может представлять собой pH крови, составляющий приблизительно 7,2-7,6, при 15 котором условно активные полипептиды являются менее активными. Данные условно активные полипептиды могут являться подходящими для нацеливания на заболевания суставов, в особенности, на воспаление суставов.

[106] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения условно активные полипептиды можно разработать для нацеливания на головной мозг. 20 Существует различие pH между двумя сторонами гематоэнцефалического барьера, причем pH со стороны головного мозга приблизительно на 0,2 единицы pH является более низким, чем pH крови. Таким образом, первый pH головного мозга, при котором условно активные полипептиды являются более активными, может составлять приблизительно от 7,0 до 7,2 (pH головного мозга), тогда как второй pH может 25 составлять приблизительно 7,4 (pH крови).

[107] Условно активный полипептид может представлять собой фермент, цитокин, рецептор, в особенности, рецептор клетки, регуляторный полипептид, растворимый полипептид, антитело или гормон.

30 [108] Условно активный полипептид может представлять собой фрагмент родительского полипептида. Например, условно активный полипептид может представлять собой фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, фрагмент фермента, фрагмент рецептора, фрагмент цитокина или фрагмент гормона. Фрагмент антитела может представлять собой Fc-фрагмент антитела.

35 [109] Fc-фрагмент можно применять в качестве родительского полипептида для получения условно активного Fc-фрагмента, характеризующегося более высокой активностью связывания с комплементом при первом pH, чем активность связывания с тем же комплементом при втором pH. Связывание Fc-фрагмента с комплементом можно использовать для обеспечения антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности. Первый pH может являться кислым в диапазоне от 5,5 до 7,2 или от 40 6,2 до 6,8, таком как pH в микроокружении опухоли, тогда как второй pH находится в диапазоне 7,2-7,6. Первый pH отличается от pH в лизосомах, в которых pH, как правило, составляет приблизительно 4,0. Также лизосомы являются месторасположением, в котором запланирована дегградация Fc-фрагмента, как и любых других полипептидов. Комплемент отсутствует в лизосомах, и опосредованная клетками 45 цитотоксичность не может быть вызвана в лизосомах.

[110] Условно активный полипептид может содержать два функциональных домена с по меньшей мере одним, предпочтительно, обоими из функциональных доменов, обладающими pH-зависимыми активностями. Данные два функциональных домена

можно эволюционировать одновременно, и можно провести отбор для идентификации обоих функциональных доменов в одном мутантном полипептиде. В качестве альтернативы, данные два функциональных домена можно независимо эволюционировать и отобрать для идентификации рН-зависимых активностей по

5 отделимости. Если два функциональных домена находятся не в одном мутантном полипептиде, их можно слить в химерный полипептид, который содержит оба из функциональных доменов, идентифицированных по отделимости.

[111] Согласно одному аспекту условно активный полипептид демонстрирует повышенную активность при первом рН по сравнению с родительским полипептидом, и сниженную активность при втором рН по сравнению с родительским полипептидом, обе в присутствии фактора, такого как белок. Белок может представлять собой белок, присутствующий в крови, сыворотке человека или в микроокружении организма, таком как микроокружение опухоли, воспаленная область и т.д. Подходящий белок может представлять собой альбумин, в частности, альбумин млекопитающего, такой как

15 бычий альбумин или альбумин человека.

[112] Согласно одному аспекту белок, такой как альбумин, присутствует в растворах для анализа, которые применяют для скрининга и отбора условно активного полипептида от мутантных полипептидов, полученных посредством этапа эволюционирования. Согласно другому аспекту растворы для анализа с белком, таким

20 как альбумин, также применяют для исследования активности отобранного условно активного полипептида в тех же или отличных условиях.

В. Конструирование условно активных полипептидов

[113] Условно активные полипептиды можно сконструировать посредством одной или нескольких методик белковой инженерии, описанных в настоящем документе.

Неограничивающие примеры методик белковой инженерии включают конъюгацию условно активных полипептидов с нуклеиновыми кислотами, конъюгацию условно активных полипептидов с наночастицами, конструирование условно активного полипептида в химерный антигенный рецептор и конструирование маскированного условно активного полипептида.

[114] Условно активные полипептиды согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с молекулой нуклеиновой кислоты, например, молекулой ДНК или РНК, посредством линкера. Условно активные полипептиды могут способствовать доставке молекулы нуклеиновой кислоты в целевое месторасположение субъекта, которое характеризуется условием, при котором условно активные полипептиды являются более активными, чем в других месторасположениях, где данное условие не

35 присутствует. Например, условно активные полипептиды могут представлять собой условно активные антитела, которые характеризуются более высокой активностью связывания с их антигенами при условии в микроокружении опухоли, чем при условии в других месторасположениях, таких как в сыворотке человека. Данный эффект можно использовать для доставки молекулы нуклеиновой кислоты в микроокружение опухоли посредством конъюгации молекулы нуклеиновой кислоты с условно активным полипептидом и введения конъюгата субъекту.

[115] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой средство для модулирования экспрессии гена в целевом месторасположении. Абнормальная экспрессия генов связана с множеством заболеваний. Таким образом, коррекция абнормальной экспрессии генов может способствовать контролю над данными заболеваниями или даже их излечиванию. Например, абнормальная экспрессия генов свойственна большинству раковых клеток,

причем некоторые гены характеризуются повышенным уровнем экспрессии в раковых клетках, такие как многие онкогены (например, рецептор 2 эпидермального фактора роста (HER2) сверхэкспрессируется в клетках рака молочной железы). Селективное ингибирование конститутивно повышенной экспрессии онкогенов обеспечивает

5 возможность ингибировать пролиферацию раковых клеток.

[116] Молекулы нуклеиновой кислоты, которые могут ингибировать экспрессию гена, включают антисмысловые РНК, малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК, олигоДНК и миметики олигонуклеотидов с незаряженным ахиральным полиамидным остовом, к которому присоединены нуклеос основания (Pooga et al., Curr

10 Cancer Drug Targets, 1(3):231-9, 2001; Pandey et al., Expert Opin Biol Ther., 9(8):975-89, 2009).

[117] Антисмысловые РНК представляют собой короткие молекулы РНК, которые могут связываться со специфичными комплементарными областями мРНК посредством спаривания оснований для ингибирования экспрессии мРНК последовательность-специфичным образом. Антисмысловая РНК может индуцировать РНКазу H, которая

15 расщепляет мРНК в сайте связывания с антисмысловой РНК, либо может физическим способом блокировать трансляцию или другие этапы процессинга мРНК и синтеза белка.

[118] Малые интерферирующие РНК (миРНК), как правило, представляют собой короткие сегменты двухцепочечной РНК с по меньшей мере частью последовательности, комплементарной последовательностям мРНК, трансляция которых должна быть

20 заблокирована. миРНК функционирует посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга генов с применением ремоделирования хроматина, ингибирования трансляции белка или прямого разрушения мРНК, которая является повсеместной в эукариотических клетках (Caplen, "Gene therapy progress and prospects. Downregulating

25 gene expression: the impact of RNA interference," Gene Ther., 11(16):1241-1248, 2004) и Bertrand et al., "Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo," Biochem BiophysRes Commun., 296(4): 1000-1004, 2002).

[119] В частности, посредством RISC миРНК может запускать мощный каскад последовательность-специфичного разрушения мРНК, которая характеризуется

30 гомологией с миРНК (Fire et al., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*," Nature 391:806-811, 1998). Когда миРНК вводят в клетки, она процессируется ферментом РНКазой III, называемой Дайсер, который расщепляет длинную миРНК на короткие дуплексы размером 21-23 нуклеотида, содержащие симметричные 3'-липкие концы длиной 2-3 нуклеотида и 5'-фосфатную и 3'-

35 гидроксильную группы (Tuschl et al., "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro," Genes Dev. 13:3191-3197, 1999; Hamilton and Baulcombe, "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants," Science, 286:950-952, 1999). Таким образом, эффективной миРНК требуется только небольшой сегмент непрерывной комплементарной последовательности с получением пары с мРНК с целью запустить

40 миРНК-опосредованный сайленсинг (Jackson and Linsley, "Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?" Trends Genet., 20:521-524, 2004). миРНК не встраиваются в геном и, таким образом, обеспечивают большую безопасность, чем плазмидные или вирусные носители.

[120] МикроРНК представляют собой класс природных небольших некодирующих

45 молекул РНК длиной 21-25 нуклеотидов. МикроРНК частично комплементарны молекулам мРНК, на которые воздействуют микроРНК. Основная функция микроРНК заключается в снижении экспрессии гена посредством репрессии трансляции, расщепления мРНК и деаденилирования. Центральный репозиторий видов миРНК,

данных о последовательностях, аннотаций и прогнозируемых мишеней в сетевом доступе, называемый miRBase, размещен на сайте Института Сенджера Великобритании. Гены микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II с получением прай-миРНК, которые содержат 5'-кэп и поли-А хвост. В ядре прай-миРНК процессируются микропроцессорным комплексом, который состоит из РНКазы III фермента Drosha и двухцепочечной РНК Pasha/DGCR8, с получением пре-миРНК. Данные пре-миРНК экспортируются кариоферином экспортином (Exp5) и комплексом Ran-ГТФ в цитоплазму, где Ran ГТФаза связывается с Exp5 с образованием ядерного гетеротримера с пре-миРНК. Данные пре-миРНК дополнительно процессируются РНКазой III, ферментом Дайсер с получением зрелой микроРНК.

[121] Другим классом нуклеиновых кислот, которые может доставлять условно активный полипептид, являются миметики олигонуклеотидов, которые содержат незаряженный ахиральный полиамидный остов, к которому присоединены нуклеосахариды. Миметик олигонуклеотидов часто называют пептидо-нуклеиновой кислотой (ПНК). Более конкретно, ПНК представляет собой аналог ДНК, в котором полиамид N-(2-аминоэтил)глицин заменяет фосфатно-рибозный кольцевой остов, и линкер метилен-карбонил соединяет природные, а также неприродные нуклеосахариды с центральным амином N-(2-аминоэтил)глицина. Несмотря на коренное изменение структуры остова, ПНК способна к последовательность-специфичному связыванию с ДНК и мРНК согласно правилу спаривания оснований Уотсона-Крика.

[122] ПНК связывается с более высокой аффинностью с комплементарной ДНК/РНК, чем природные нуклеиновые кислоты, отчасти в связи с отсутствием отрицательного заряда на остова и, следовательно, сниженным отталкиванием зарядов, а также в связи с благоприятными геометрическими факторами. Комплекс ПНК и ДНК/мРНК является очень стабильным в биологических жидкостях и приводит к ингибированию транскрипции и трансляции генов-мишеней в результате специфичной гибридизации с ДНК или мРНК. Как правило, ПНК синтезируют с применением хорошо известных протоколов твердофазного пептидного синтеза. См. публикации Kim et al., J. Am. Chem. Soc, 115, 6477-6481, 1993; Hyrup et al., J. Am. Chem. Soc, 116, 7964-7970, 1994; Egholm et al., Nature, 365, 566-568, 1993; Dueholm et al., New J. Chem., 21, 19-31, 1997; Wittung et al., J. Am. Chem. Soc, 118, 7049-7054, 1996; Leijon et al., Biochemistry, 33, 9820-9825, 1994, Orum et al., BioTechniques, 19, 472-480, 1995; Tomac et al., J. Am. Chem. Soc, 118, 5544-5552, 1996. В отличие от ДНК, которая денатурирует при обработке сильными кислотами и гидролизует в гидроокисях щелочи, ПНК являются полностью стабильными в кислотах и достаточно стабильными в слабых щелочах.

[123] Другим классом нуклеиновых кислот, которые могут доставлять условно активные полипептиды, являются олигоДНК. ОлигоДНК представляют собой короткие одноцепочечные сегменты ДНК, которые после поступления в плазму клетки могут селективно ингибировать экспрессию гена с последовательностью, комплементарной олигоДНК. Для применений в качестве антисмысловой молекулы олигоДНК взаимодействует и образует дуплекс с мишенью мРНК или пре-мРНК и ингибирует ее трансляцию или процессинг, как следствие, ингибируя биосинтез белка. Для вариантов применения в качестве антигена олигоДНК должна поступить в ядро клетки, образовать триплекс с двухцепочечной геномной ДНК и ингибировать транскрипцию гена, таким образом, нарабатывается меньше мРНК, что приводит к тому, что образуется меньше продукта гена, белка.

[124] Следующим классом нуклеиновых кислот, которые могут доставлять условно активные полипептиды, являются сферические нуклеиновые кислоты СНК, см.

публикацию Zhang, J Am Chem Soc, 134(40):16488-16491, 2012). СНК включают плотно функционализированные и в высокой степени ориентированные нуклеиновые кислоты, ковалентно присоединенные к поверхности металлического, полупроводникового или изолирующего неорганического или полимерного материала сердцевин. СНК могут также представлять собой полые структуры без сердцевин, состоящие практически исключительно из молекул нуклеиновой кислоты. Такие сферические нуклеиновые кислоты способны обходить природные средства защиты субъекта от экзогенных нуклеиновых кислот. Сферические нуклеиновые кислоты обеспечивают защиту и эффективную доставку нуклеиновых кислот с использованием уникальных свойств, которые являются следствием их плотно упакованного, в высокой степени ориентированного каркаса нуклеиновой кислоты. Такие каркасы создают области с высокой локальной концентрацией соли, которые в сочетании со стерическим ингибированием выступают для снижения активности нуклеазы и защиты нуклеиновых кислот от ферментативного расщепления. Кроме того, данные сферические нуклеиновые кислоты рекрутируют к своим поверхностям скэвенджер-белки из природного внеклеточного окружения, что способствует эндоцитозу.

[125] После поступления в цитоплазму сферические нуклеиновые кислоты могут ингибировать экспрессию генов-мишеней посредством пути антисмысловой или миРНК. Следовательно, сферические нуклеиновые кислоты обеспечивают несколько преимуществ по сравнению с вирусными векторами и множеством других синтетических систем, включая низкую токсичность, низкую иммуногенность, резистентность к ферментативному расщеплению и более устойчивый нокдаун генов. Условно активные полипептиды, в особенности, условно активные антитела, могут доставлять сферические нуклеиновые кислоты в целевое месторасположение, такое как пораженные заболеванием или воспаленные ткани (например, опухоли и воспаленные суставы).

[126] Условно активные полипептиды можно также конъюгировать с наночастицами посредством линкера для облегчения доставки наночастиц в целевое месторасположение, которое характеризуется условием, в котором условно активный полипептид является более активным. Наночастицы являются известными носителями для токсинов, радиоактивных средств или других терапевтических средств, которые инкапсулируют в наночастицы.

[127] Терапевтическое средство, инкапсулированное в наночастицы, может представлять собой белок, который способен дифференцировать опухолевые клетки и, таким образом, возможно, вызывать обратное развитие опухолевых клеток обратно к нормальным клеткам (Friedmann-Morvinski and Verma, «Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells," EMBO Reports, 15(3):244-253, 2014). Наночастицы можно присоединить к условно активному антителу для селективной доставки присоединенных наночастиц и инкапсулированного терапевтического средства в окружение, в котором условно активное антитело является наиболее активным.

[128] В настоящем изобретении можно использовать несколько типов наночастиц с различными конфигурациями. Наночастицы могут быть изготовлены из ряда биосовместимых материалов, включая биостойкий полимер, разлагаемый биологическим способом полимер, фуллерены, липиды или их комбинации. Биостойкие полимеры означают полимеры, которые не разлагаются *in vivo*. Разлагаемые биологическим способом полимеры означают полимеры, которые способны быть расщепленными после доставки пациенту. Например, когда полимеры подвергаются воздействию жидкостей организма, таких как кровь, они могут постепенно всасываться и/или устраняться ферментами в организме. Способы получения наночастиц с различными

скоростями разложения известны специалистам в данной области техники, см., например патент США №6,451,338, патент США №6,168,804 и патент США №6,258,378.

[129] Иллюстративные наночастицы согласно настоящему изобретению включают липосомы, полимерсомы и полимерные частицы. Липосома означает компартмент, который полностью заключен в бислой, как правило, состоящий из фосфолипидов. Липосомы можно получить согласно стандартным методикам, известным специалистам в данной области техники. Одна методика заключается в суспендировании подходящего липида, например, фосфатидилхолина, в водной среде с последующей ультразвуковой обработкой смеси. Другая методика заключается в быстром перемешивании раствора липида в смеси этанол-вода, например, посредством инъектирования липида с применением иглы в перемешиваемый раствор этанол-вода. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения липосомы могут также содержать дополнительно или в качестве альтернативы другие амфифильные вещества, такие как сфингомиелин или липиды, содержащие поли(этиленгликоль) (ПЭГ).

[130] Полимерсомы содержат ди- или три-блоксополимеры, которые были модифицированы с получением бислойных структур, аналогичных липосомам. В зависимости от длины и состава блоксополимера полимерсомы могут являться по существу более прочными, чем липосомы. Кроме того, способность контролировать химию каждого блока в блоксополимере обеспечивает настройку состава полимерсом для соответствия целевому применению. Например, толщину мембраны полимерсом, т.е. толщину бислойной структуры, можно контролировать посредством варьирования длины цепи отдельных блоков в блоксополимере. Регулировка температур стеклования каждого блока в сополимере будет влиять на текучесть и, вследствие этого, проницаемость мембраны полимерсом. Даже механизм высвобождения инкапсулированного средства можно модифицировать посредством изменения характеристик сополимеров.

[131] Полимерсомы можно получить в результате процесса, включающего (i) растворение блоксополимера в органическом растворителе, (ii) нанесение полученного раствора на поверхность сосуда, а затем (iii) удаление растворителя, который оставляет пленку на сополимере на стенке сосуда. Затем пленку гидратируют с образованием полимерсом. В качестве альтернативы, растворение блоксополимера в растворителе и последующее добавление слабого растворителя для одного из блоков сополимера также позволит получить полимерсомы.

[132] Терапевтические средства можно инкапсулировать в полимерсомы с применением нескольких методик. Например, терапевтическое средство можно смешать в воде, которую затем используют для регидратации пленки сополимера. Другой пример заключается в осмотическом перемещении терапевтического средства в сердцевину заранее сформированных полимерсом; данный процесс известен как принудительная загрузка. Еще один пример заключается в применении методики двойной эмульсии, которая позволяет получить полимерсомы с относительной монодисперсностью и высокой эффективностью загрузки. Методика двойной эмульсии включает применение микрожидкостной технологии для получения двойных эмульсий, содержащих капли воды, окруженные слоем органического растворителя. Затем данные структуры капель в капле диспергируют в непрерывной водной фазе. Блоксополимер растворяют в органическом растворителе, и он самособирается в прото-полимерсомы на концентрических поверхностях раздела двойной эмульсии. Итоговые полимерсомы образуются после полного испарения органического растворителя из каркаса прото-полимерсом. Данная методика обеспечивает полный контроль над размером

полимерсом. Кроме того, способность поддерживать полное разделение внутренних жидкостей от внешней жидкости в течение процесса обеспечивает чрезвычайно эффективное инкапсулирование терапевтического средства.

[133] Полимерная частица означает твердую или пористую частицу, в отличие от каркасной структуры липосом и полимерсом. Способы адгезии терапевтического средства к поверхности или встраивания биологически активного средства в структуру полимерной частицы известны специалистам в данной области техники.

[134] Полимеры, которые можно использовать для получения наночастиц согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, поли(N-ацетилглюкозамин) (хитин), хитозан, поли(3-гидроксивалерат), поли(лактид-ко-гликолид), поли(3-гидроксibuтират), поли(4-гидроксibuтират), поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксивалерат), сложный полиортоэфир, полиангидрид, поли(гликолевую кислоту), поли(гликолид), поли(L-молочную кислоту), поли(L-лактид), поли(D,L-молочную кислоту), поли(D,L-лактид), поли(L-лактид-ко-D,L-лактид), поли(капролактон), поли(L-лактид-ко-капролактон), поли(D,L-лактид-ко-капролактон), поли(гликолид-ко-капролактон), поли(триметилен карбонат), полиэфирамид, поли(гликолевую кислоту-ко-триметилен карбонат), ко-поли(эфиры-сложные эфиры) (например, PEO/PLA), полифосфазены, биомолекулы (такие как фибрин, фибриновый клей, фибриноген, целлюлоза, крахмал, коллаген и гиалуроновая кислота, эластин и гиалуроновая кислота), полиуретаны, кремнийорганические вещества, сложные полиэфиры, полиолефины, полиизобутилен и сополимеры этилена-альфаолефина, акриловые полимеры и сополимеры, отличные от полиакрилатов, винилгалогенидные полимеры и сополимеры (такие как поливинилхлорид), поливинилэфиры (такие как поливинилметилэфир), поливинилиденгалиды (такие как поливинилиденхлорид), полиактилонитрил, поливинилкетоны, поливинил-ароматические соединения (такие как полистирен), поливинилсложные эфиры (такие как поливинилацетат), сополимеры акрилонитрила-стирола, смолы акрилонитрил-бутадиен-стирол (ABS), полиамиды (такие как Nylon 66 и поликапролактан), поликарбонаты, включая поликарбонаты на основе тирозина, полиоксиметилены, полиимиды, полиэфиры, полиуретаны, вязкое волокно, вязкое волокно-триацетат, целлюлозу, ацетат целлюлозы, бутират целлюлозы, ацетатбутират целлюлозы, целлофан, нитрат целлюлозы, пропионат целлюлозы, эфиры целлюлозы и карбоксиметилцеллюлозу.

[135] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения помимо селективности, обеспечиваемой условно активными полипептидами, наночастицы могут также обеспечивать селективность в отношении тканей вследствие покрытия. Например, наночастицы могут быть покрыты электростатически адсорбированными пептидными покрытиями на основе поли(глутаминовой кислоты) для изменения внешнего состава сердцевинной частицы. Отрицательно заряженные пептиды на основе полиглутаминовой кислоты, содержащие лиганд Аргинин-Глицин-Аспарагиновая кислота (RGD), могут повышать доставку гена *in vitro* в эндотелиальные клетки по сравнению с покрытыми частицами со скремблированной последовательностью, которые содержат RDG вместо RGD. Данные пептиды состоят из трех компонентов: участок поли(глутаминовой кислоты), который обеспечивает отрицательный заряд, линкер полиглицин и концевая последовательность, которая отличается по заряду и характеризуется потенциалом изменять биофизические свойства частицы и селективность в отношении тканей. Покрытия, а также частицы сами по себе являются разлагаемыми биологическим способом по их амидной и сложноэфирной связи, соответственно. См. публикацию Harris et al. ("Tissue-Specific Gene Delivery via Nanoparticle Coating," *Biomaterials*, vol. 31,

pp. 998-1006, 2010).

[136] Т-клетки используются иммунной системой млекопитающего для борьбы с веществами или клетками, содержащими чужеродные антигены. При встрече с солидной опухолью Т-клетки часто оказываются неспособными обеспечить эффективный ответ.

Даже когда Т-клетки достигают участков опухоли, они сталкиваются с преградой иммуносупрессивных факторов, которые позволяют раковым клеткам избежать действия иммунной системы. В технологии ХАР-Т применяют способы генной инженерии для перепрограммирования природных циркулирующих Т-клеток посредством встраивания химерного антигенного рецептора (ХАР) в Т-клетки для получения в высокой степени специфичных ХАР-Т-клеток, в которых ХАР направляет сконструированные ХАР-Т-клетки в ткань-мишень посредством специфичного связывания с антигеном на поверхности ткани-мишени. Таким образом, ХАР-Т-клетки могут специфично нацеливаться на опухолевые клетки, что делает ХАР-Т-клетки значительно более эффективными, чем природные циркулирующие Т-клетки. ХАР-Т-клетки можно также сконструировать для нацеливания на другие ткани-мишени, такие как воспаленные суставы и ткань головного мозга.

[137] ХАР согласно настоящему изобретению включают по меньшей мере одну антигенспецифичную нацеливающую область (antigen specific targeting region, ASTR), внеклеточный спейсерный домен (ESD), трансмембранный домен (ТМ), один или несколько костимулирующих доменов (CSD) и домен внутриклеточной передачи сигналов (ISD), см. ФИГ. 5 и публикацию Jensen et al., "Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells," Immunol Rev., vol. 257, pp.127-144, 2014. После того как ASTR специфично связывается с антигеном-мишенью на опухоли или другой ткани-мишени, ISD активирует внутриклеточную передачу сигналов в ХАР-Т-клетках. Например, ISD может перенаправлять специфичность и реактивность ХАР-Т клетки в отношении выбранной мишени (например, опухолевых клеток или других клеток-мишеней) способом, не рестриктированным по МНС, на основании антигенсвязывающих свойств ХАР. Не рестриктированное по МНС распознавание антигена обеспечивает ХАР-Т-клеткам способность распознавать опухолевую клетку и инициировать процессинг антигена, тем самым обходя основной механизм избегания опухолью контроля со стороны иммунной системы. Согласно варианту реализации настоящего изобретения ESD и/или CSD являются необязательными. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ASTR обладает биспецифичностью, которая позволяет ей специфично связываться с двумя различными антигенами или эпитопами.

[138] Условно активный полипептид согласно настоящему изобретению можно сконструировать в виде ASTR или ее части, с целью сделать ХАР более активными для связывания с антигеном-мишенью в конкретном окружении, таком как микроокружение опухоли или синовиальная жидкость, чем в крови или другой части организма, в которых присутствует отличное окружение. Такие ХАР могут предпочтительно доставлять Т-клетки в участок заболевания, таким образом, значительно снижая побочные эффекты, вызванные атакой Т-клеток на нормальную ткань. Это позволяет использовать более высокие дозы Т-клеток для повышения терапевтической эффективности и улучшает переносимость лечения субъектом.

[139] Данные ХАР являются в особенности ценными для разработки новых терапевтических средств, которые необходимы в течение коротких или ограниченных периодов времени в субъекте. Примеры полезных вариантов применения включают варианты системного лечения в высоких дозах, а также варианты локализованного

лечения в высоких концентрациях. См. публикацию Maher, immunotherapy of Malignant Disease Using Chimeric Antigen Receptor Engrafted T Cells," ISRN Oncology, vol. 2012, article ID 278093, 2012.

[140] ASTR могут содержать условно активный полипептид, такой как антитело, в особенности, одноцепочечное антитело, или его фрагмент, который специфично связывается с антигеном на опухолях или других тканях-мишенях. Некоторые примеры полипептидов, подходящих для ASTR, включают связанные цитокины (которые приводят к распознаванию клеток, несущих рецептор цитокина), аффитела, лиганд-связывающие домены из природных рецепторов и растворимые белковые/пептидные лиганды для рецептора, например, на опухолевой клетке. Фактически, практически любую молекулу, способную к связыванию с аффинностью с данным антигеном, можно применять в ASTR.

[141] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ХАР согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере две ASTR, которые нацелены по меньшей мере на два различных антигена или два эпитопа на одном антигене. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ХАР содержит три или более ASTR, которые нацелены по меньшей мере на три или более различных антигенов или эпитопов. Когда в ХАР присутствует множество ASTR, ASTR могут быть организованы в тандем и могут быть разделены линкерными пептидами (ФИГ. 5).

[142] Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения ASTR включает диатело. В диателе scFv созданы с линкерными пептидами, которые являются слишком короткими для двух вариабельных областей, чтобы сворачиваться вместе, что приводит к димеризации scFv. Еще более короткие линкеры (одна или две аминокислоты) приводят к образованию тримеров, так называемых триател или трител. Тетратела можно также применять в ASTR.

[143] Антигены, на которые нацелены ХАР, присутствуют на поверхности или внутри клеток в ткани, которая запланирована для удаления, такой как опухоли, железистая гиперплазия (например, предстательной железы), бородавки и нежелательная жировая ткань. Несмотря на то, что антигены поверхности более эффективно распознаются ASTR ХАР и связываются ими, ХАР могут также нацеливаться на внутриклеточные антигены. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигены-мишени, предпочтительно, являются специфичными к раку, воспалительному заболеванию, нейрональным расстройствам, диабету, сердечно-сосудистому заболеванию или инфекционным заболеваниям. Примеры антигенов-мишеней включают антигены, экспрессия которых осуществляется различными иммунными клетками, карциномами, саркомами, лимфомами, лейкозией, герминогенными опухолями, бластомами и клетками, ассоциированными с различными гематологическими заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями.

[144] Антигены, специфичные для рака, на которые может быть нацелена ASTR, включают один или несколько из 4-1BB, 5T4, антигена аденокарциномы, альфа-фетопротейна, BAFF, клеток В-лимфомы, C242-антигена, CA-125, карбоангидразы 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептора IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, РЭФР (рецептора эпидермального фактора роста), ЕpCAM, CD3, FAP, дополнительного домена-В фибронектина, рецептора фолата 1, GD2, GG3 ганглиозида, гликопротеина 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, рецепторной киназы фактора роста гепатоцитов человека, рецептора ИФР-1, ИФР-I, IgG1, LI-CAM, ИЛ-13,

ИЛ-6, рецептора инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha 5 \beta 1$, интегрин $\alpha \nu \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцина CanAg, N-гликолилнейраминной кислоты, NPC-1C, РФПТ-а, PDL192, фосфатидилсерина, клеток карциномы предстательной железы, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенаскина C, ТФР-бета 2, ТФР- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевого антигена СТАА16.88, ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов)-А, РФРЭС (рецептора фактора роста эндотелия сосудов) -1, РФРЭС2 или виментина.

[145] Антигены, специфичные для воспалительных заболеваний, на которые может нацеливаться ASTR, включают один или несколько из AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксина-1), CD125, CD147 (базигина), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (IgE-рецептора), CD25 (цепи рецептора ИЛ-2), CD3, CD4, CD5, ИФН-а, ИФН- γ , IgE, Fc-области IgE, ИЛ-1, ИЛ-12, ИЛ-23, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-17А, ИЛ-22, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-5, ИЛ-6, рецептора ИЛ-6, интегрин $\alpha 4$, интегрин $\alpha 4 \beta 7$, антигена ламы Lama glama, LFA-1 (CD11a), MEDI-528, миостатина, OX-40, rhuMAb $\beta 7$, склероцина, SOST, ТФР бета-1, ФНО-а или ФРЭС-А.

[146] Антигены, специфичные для нейрональных расстройств, на которые могут нацеливаться ASTR согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из бета-амилоидов или MABT5102A. Антигены, специфичные для диабета, на которые может нацеливаться ASTR согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из L-I β или CD3. Антигены, специфичные для сердечно-сосудистых заболеваний, на которые может нацеливаться ASTR согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из C5, кардиального миозина, CD41 (интегрин альфа-lib), фибрина II, бета-цепи, ITGB2 (CD 18) и сфингозин-1-фосфата.

[147] Антигены, специфичные для инфекционных заболеваний, на которые может нацеливаться ASTR согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из токсинов сибирской язвы, CCR5, CD4, фактора агглютинации А, цитомегаловируса, гликопротеина В цитомегаловируса, эндотоксина, Escherichia coli, поверхностного антигена вируса гепатита В, вируса гепатита В, ВИЧ-1, Hsp90, гемагглютинирина вируса гриппа А, липотейхоевой кислоты, Pseudomonas aeruginosa, гликопротеина вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса и ФНО-а.

[148] Другие примеры антигенов-мишеней включают белки поверхности, обнаруживаемые на раковых клетках специфичным или амплифицированным способом, например, рецептор ИЛ-14, CD19, CD20 и CD40 для В-клеточной лимфомы, антигены Левис Y и СЕА для различных карцином, антиген Tag72 для рака молочной железы и рака толстой и прямой кишок, РЭФР (рецептор эпидермального фактора роста) для рака легких, фолатсвязывающий белок и белок HER-2, амплификация которого часто происходит при карциноме молочной железы человека и карциноме яичников, или вирусные белки, например, белки Gp120 и gp41 оболочки ВИЧ, белки оболочки, полученные из вирусов гепатита В и С, гликопротеин В и другие гликопротеины оболочки цитомегаловируса человека и белки оболочки, полученные из онковирусов, таких как ассоциированный с саркомой Капоши вирус герпеса. Другие потенциальные антигены-мишени включают CD4, где лиганд представляет собой гликопротеин gp120 оболочки ВИЧ, и другие вирусные рецепторы, например, ICAM, который является рецептором риновируса человека, и связанную с ним рецепторную молекулу для полиовируса.

[149] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ХАР могут нацеливаться на антигены, которые привлекают лечащие рак клетки, такие как клетки НК, для активации лечащих рак клеток посредством действия в качестве иммунной

эффекторной клетки. Примером этого является ХАР, который нацелен на антиген CD16A для привлечения клеток НК для борьбы с CD30-экспрессирующими злокачественными образованиями. Биспецифичное тетравалентное антитело AFM13 является примером антитела, которое может обеспечивать данный

5 эффект. Дополнительные подробности данного типа варианта реализации можно найти, например, в публикации Rothe, A., et al., "A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma," Blood, 25 June 2015, VI. 125, no. 26, pp. 4024-4031.

[150] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
10 внеклеточный спейсерный домен и трансмембранный домен могут быть устойчивыми к убиквитинилированию, что может усилить передачу сигналов ХАР-Т-клеткой и, таким образом, усилить противоопухолевую активность (Kunii et al., "Enhanced function of redirected human t cells expressing linker for activation of t cells that is resistant to ubiquitylation," Human Gene Therapy, vol. 24, pp. 27-37, 2013). В данной области внеклеточный спейсерный
15 домен находится за пределами ХАР-Т-клеток и, таким образом, подвергается воздействию различных условий и может потенциально быть изготовлен условно устойчивым к убиквитинилированию.

С. Конструирование маскированного условно активного полипептида

[151] Условно активный полипептид, в особенности, условно активное антитело
20 согласно настоящему изобретению может обладать замаскированной условной активностью и/или может обладать активностью его конъюгированного средства, маскированной при помощи маскирующего фрагмента. Маскированная активность станет доступной после удаления или отщепления маскирующего фрагмента от условно
25 активного полипептида. Подходящая технология маскирования описана, например, в публикации Desnoyers et al., "Tumor-Specific Activation of an EGFR-Targeting Probody Enhances Therapeutic Index," Sci. Transl. Med. 5, 207ra144, 2013.

[152] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активное антитело связывают с маскирующим фрагментом, который маскирует
30 условную активность и/или активность его конъюгированного средства. Например, когда условно активное антитело связывают с маскирующим фрагментом, такое связывание или модификация могут влиять на структурное изменение, которое уменьшает или ингибирует способность условно активного антитела специфичным образом связываться со своим антигеном. Когда условно активное антитело достигает
35 ткани-мишени или микроокружения, маскирующий фрагмент расщепляется ферментом, присутствующим в ткани-мишени или в микроокружении, тем самым высвобождая маскированную активность. Например, фермент может представлять собой протеазу, обычно активную в микроокружении опухоли, которая может расщеплять маскирующий фрагмент для высвобождения условно активного антитела с активностью в опухолевой ткани.

[153] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активность
40 маскируют, чтобы она составляла менее приблизительно 50% от первоначальной активности, или менее приблизительно 30% от первоначальной активности, или менее приблизительно 10% от первоначальной активности, или менее приблизительно 5% от первоначальной активности, или менее приблизительно 2% от первоначальной
45 активности, или менее приблизительно 1% от первоначальной активности, или менее приблизительно 0,1% от первоначальной активности, или менее приблизительно 0,01% от первоначальной активности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, например, для того, чтобы обеспечить достаточное время для доставки,

разработан маскирующий эффект, который длится по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более при измерении *in vivo* или при вытеснении мишени при проведении иммуносорбентного анализа *in vitro*.

5 [154] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент по своей структуре подобен природному партнеру по связыванию (антигену) условно активного антитела. Маскирующий фрагмент может представлять собой модифицированный природный партнер по связыванию условно
10 активного антитела, который содержит изменения аминокислот, которые по меньшей мере незначительно уменьшают аффинность и/или avidность связывания с условно активным антителом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент не характеризуется или по существу не характеризуется гомологией с природным партнером по связыванию условно активного
15 антитела. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент характеризуется идентичностью последовательности не более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% с природным партнером по связыванию условно активного антитела.

[155] Маскирующий фрагмент можно получить во множестве различных форм. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий
20 фрагмент может являться известным партнером по связыванию условно активного антитела при условии, что маскирующий фрагмент связывается с условно активным антителом с меньшей аффинностью и/или avidностью, чем белок-мишень, на который нацеливается условно активное антитело, с последующим расщеплением маскирующего фрагмента так, чтобы уменьшить интерференцию маскирующего фрагмента с желаемым
25 связыванием с мишенью. Таким образом, маскирующий фрагмент, предпочтительно, представляет собой фрагмент, который маскирует условно активное антитело от связывания с мишенью до того, как маскирующий фрагмент будет расщеплен, однако по существу или значимым образом не препятствует или не конкурирует за связывание активной молекулы с мишенью после того, как маскирующий фрагмент отщепляется
30 от антитела. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения условно активное антитело и маскирующий фрагмент не содержат аминокислотных последовательностей пары природных партнеров по связыванию, так что по меньшей мере одно из условно активных антител и маскирующих фрагментов не содержит аминокислотной последовательности члена природного партнера по связыванию.

35 [156] В качестве альтернативы, маскирующий фрагмент может специфически не связываться с условно активным антителом, однако может препятствовать связыванию условно активного антитела с мишенью посредством неспецифичных взаимодействий, таких как стерическое несоответствие. Например, маскирующий фрагмент можно расположить таким образом, что структура или конформация антитела будет
40 способствовать маскировке условно активного антитела маскирующим фрагментом, например, посредством взаимодействия на основе заряда, тем самым препятствуя доступу мишени к условно активному антителу.

[157] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения маскирующий фрагмент связан с условно активным антителом посредством
45 ковалентного связывания. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения связыванию условно активного антитела со своей мишенью препятствует связывание маскирующего фрагмента с N-концом условно активного антитела. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения условно активное антитело

связывается с маскирующим фрагментом при помощи дисульфидных мостиков пары цистеин-цистеин между маскирующим фрагментом и условно активным антителом.

[158] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активное антитело дополнительно связывают с расщепляемым фрагментом (cleavable moiety, СМ). СМ обладает способностью к расщеплению ферментом либо СМ обладает способностью к восстановлению при помощи восстанавливающего средства, либо СМ обладает способностью к фотолизу. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность аминокислот СМ может перекрываться или быть включена в маскирующий фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СМ находится между условно активным антителом и маскирующим фрагментом. Следует отметить, что весь СМ или его часть может способствовать маскировке условно активного антитела перед расщеплением. При расщеплении СМ условно активное антитело становится более активным при связывании со своим антигеном.

[159] СМ может представлять собой субстрат для фермента, который локализуется совместно с антигеном-мишенью в участке лечения у субъекта. В качестве альтернативы или дополнительно, СМ может содержать дисульфидную связь пары цистеин-цистеин, которая расщепляется в результате восстановления данной дисульфидной связи. СМ также может представлять собой фотолабильный субстрат, активируемый источником света.

[160] Ферменты, которые расщепляют СМ, должны, предпочтительно, располагаться в желаемой ткани-мишени для условно активного антитела, где условно активное антитело является более активным при условии, присутствующем в ткани-мишени (аберрантное условие), такой как, например, пораженная заболеванием ткань или опухолевая ткань. Например, существуют известные протеазы с повышенным уровнем активности при ряде типов рака, например, солидных опухолей. См., например, публикацию La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7):1414-1421. Неограничивающие примеры таких заболеваний включают: все типы рака (молочной железы, легких, толстой и прямой кишки, предстательной железы, головы и шеи, поджелудочной железы и т.д.), ревматоидный артрит, болезнь Крона, меланомы, СКВ (системную красную волчанку), сердечнососудистые повреждения, ишемию и т.д. В этой связи можно отобрать подходящий СМ, содержащий пептидный субстрат, который расщепляется протеазой, присутствующей в опухолевой ткани, в частности, присутствующей в повышенных уровнях в опухолевой ткани по сравнению с не являющимися раковыми тканями.

[161] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ может представлять собой субстрат для фермента, выбранного из группы, состоящей из легумина, плазмина, TMPRSS-3/4, MMP-9, MTI-MMP, катепсина, каспазы, эластазы нейтрофилов человека, бета-секретазы, УАП (активатора плазминогена урокиназного типа) и ПСА (простатического специфического антигена). Фермент, который расщепляет СМ, присутствует в относительно более высоких уровнях в ткани-мишени подвергающегося лечению участка (например, пораженной заболеванием ткани или опухолевой ткани, например, для терапевтического лечения или диагностического лечения), чем в ткани участков, которые не подвергают лечению (например, в здоровых тканях). Следовательно, помимо условной активности антитела, которое может быть более активным в пораженной заболеванием ткани или опухолевой ткани, указанный фермент, присутствующий в пораженной заболеванием ткани или опухолевой ткани, может расщеплять СМ, что дополнительно усиливает активность условно активного

антитела или активность конъюгированного средства. Немодифицированный или нерасщепленный СМ может обеспечивать эффективное ингибирование или маскировку активности условно активного антитела, так что условно активное антитело является менее активным в нормальной ткани (нормальное физиологическое условие). Двойной

5 механизм подавления активности условно активных антител в нормальной ткани (условная активность и маскирующий фрагмент) позволяет применять более высокую дозировку условно активного антитела без значимых побочных эффектов.

[162] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения СМ может представлять собой субстрат фермента, выбранного из ферментов, перечисленных

10 ниже в таблице 1.

Таблица 1. Иллюстративные ферменты/протеазы

ADAM 10	Каспаза 8	Катепсин S	MMP 8
ADAM12	Каспаза 9	FAP	MMP 9
ADAM 17	Каспаза 10	Гранзим В	MMP-13
ADAMTS	Каспаза 11	Гуанидинбензоатаза (GB)	MMP 14
ADAMTS5	Каспаза 12	Гепсин	MT-SP1
BACE	Каспаза 13	Эластаза нейтрофилов человека (ЭНЧ)	Неприлизин
Каспазы	Каспаза 14	Легумин	NS3/4A
Каспаза 1	Катепсины	Матриптаза 2	Плазмин
Каспаза 2	Катепсин А	Мерпин	PSA
Каспаза 3	Катепсин В	MMP 1	PSMA
Каспаза 4	Катепсин D	MMP 2	TACE
Каспаза 5	Катепсин Е	MMP 3	TMPS 3/4
Каспаза 6	Катепсин К	MMP 7	УАП
Каспаза 7	MTI-MMP		

[163] В качестве альтернативы или дополнительно, СМ может содержать дисульфидную связь цистеиновой пары, которая, таким образом, расщепляется восстанавливающим средством, таким как восстанавливающее средство клетки, включающее глутатион (GSH), тиоредоксины, НАДФН, флавины, аскорбат и т.п., которое может присутствовать в больших количествах в ткани солидной опухоли или

25 ткани, прилежащей к солидной опухоли.

[164] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активное антитело содержит как СМ, так и маскирующий фрагмент. Снятие маскировки с активности условно активного антитела происходит при расщеплении СМ ферментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения может быть желательным осуществить вставку одного или нескольких линкеров, например, гибких

35 линкеров, между антителом, маскирующим фрагментом и СМ, чтобы таким образом обеспечить гибкость. Например, маскирующий фрагмент и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, в особенности, Gly и Ser, в частности, Gly) для обеспечения требуемой гибкости. В связи с этим может быть эффективным введение одной или нескольких аминокислот для обеспечения гибкого

40 линкера. Например, маскируемое условно активное антитело может содержать следующие структуры (где приведенная ниже формула представляет собой аминокислотную последовательность либо в направлении от N- к С-концу, либо в направлении от С- к N-концу):

(MM)-L₁-(CM)-(AB)

(MM)-(CM)-L₁-(AB)

(MM)-L₁-(CM)-L₂-(AB)

Цикло[L₁-(MM)-L₂-(CM)-L₃-(AB)],

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, а АВ представляет собой условно активное антитело; L_1 , L_2 и L_3 каждый представляют собой независимо друг от друга необязательно присутствующие или отсутствующие, одинаковые или различные гибкие линкеры, которые включают по меньшей мере одну гибкую аминокислоту (например, Gly); и там, где присутствует «цикло», вся структура представлена в форме циклической структуры вследствие присутствия дисульфидной связи между парой цистеинов на N- и С-концах структуры или вблизи от них.

[165] Линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают маскирующему фрагменту гибкость для содействия ингибированию активности условно активного антитела. Такие линкеры, как правило, называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры можно легко отобрать, и они могут характеризоваться любой подходящей различной длиной, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и их длина может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

[166] Иллюстративные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)_n, полимеры глицина-серина (включая, например, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ и $(GGGS)_n$, где n представляет собой целое число по меньшей мере один, полимеры глицина-аланина, полимеры аланина-серина и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Иллюстративные гибкие линкеры включают, без ограничения, Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Ser-Ser-Gly и т.п.

[167] Некоторые из методов, применяемых для маскировки активности условно активного антитела, описаны в публикации WO 2010081173 A2.

[168] Настоящее изобретение обеспечивает способ получения условно активного полипептида из родительского полипептида, такого как полипептид дикого типа или терапевтический полипептид. Способ включает этапы эволюционирования ДНК, которая кодирует родительский полипептид, с применением одной или нескольких методик эволюционирования для получения мутантной ДНК; экспрессию мутантной ДНК для получения мутантных полипептидов; проведение анализа мутантного полипептида и родительского полипептида при первом условии и анализа при втором условии; и отбор из мутантных полипептидов условно активного полипептида, который демонстрирует как (а) снижение активности в анализе при первом условии по сравнению с родительским полипептидом, так и (б) повышение активности в анализе при втором условии по сравнению с родительским полипептидом. Анализ при первом условии и анализ при втором условии проводят в растворах для анализа, содержащих по меньшей мере один компонент, который выбран из неорганического соединения, иона и органической молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первое условие представляет собой нормальное физиологическое условие, и второе условие представляет собой аберрантное условие.

[169] Условно активные полипептиды обратимым или необратимым образом являются инактивированными при первом условии или нормальном физиологическом условии, но являются активными при втором условии или аберрантных условиях на том же или эквивалентном уровне, что и при первом условии или нормальном физиологическом условии. Данные условно активные полипептиды и способы получения

данных полипептидов описаны в патенте США №8,709,755 В2. Условно активные полипептиды являются в особенности ценными для разработки новых терапевтических средств, которые являются активными в течение коротких или ограниченных периодов времени внутри хозяина. Это в особенности ценно тогда, когда длительное действие терапевтических средств при данной дозе будет неблагоприятным для хозяина и когда требуется ограниченная активность для проведения желаемой терапии. Примеры эффективных применений включают местное или системное лечение в высоких дозах, а также локализованные средства для лечения в высокой концентрации. Инактивацию при первом условии или нормальном физиологическом условии можно определить посредством комбинации введения доз и скорости инактивации полипептида. Данная инактивация, основанная на условии, особенно важна для содержащих ферменты терапевтических средств, когда каталитическая активность вызывает значительные отрицательные эффекты за относительно короткий период времени.

[170] Настоящее описание также относится к способам конструирования или эволюционирования родительского полипептида для получения условно активного полипептида, который обратимым или необратимым образом активируется или инактивируется в течение времени, или активируется или инактивируется только при нахождении в определенных микроокружениях тела, включая определенные органы тела (такие как микроокружение опухоли, синовиальная жидкость, мочевого пузыря или почка). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активные полипептиды являются антителами или фрагментами антитела против одного или нескольких белков-мишеней (антигенов), описанных в настоящем документе.

[171] Условно активный полипептид может представлять собой выделенный полипептид с рН-зависимой активностью, причем активность при первом рН по меньшей мере приблизительно в 1,3 раза превышает активность при втором рН в присутствии молекулы, которая выбрана из гистидина, гистамина, гидрогенизированного аденозиндифосфата, гидрогенизированного аденозинтрифосфата, цитрата, бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфиды, сульфиды водорода, аммония, дигидрофосфата и любой комбинации указанных молекул. Та же активность не является рН-зависимой при отсутствии малой молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активность при первом рН по меньшей мере приблизительно в 1,5, или по меньшей мере приблизительно в 1,7, или по меньшей мере приблизительно в 2,0, или по меньшей мере приблизительно в 3,0, или по меньшей мере приблизительно в 4,0, или по меньшей мере приблизительно в 6,0, или по меньшей мере приблизительно в 8,0, или по меньшей мере приблизительно в 10,0, или по меньшей мере приблизительно в 20,0, или по меньшей мере приблизительно в 40,0, или по меньшей мере приблизительно в 60,0, или по меньшей мере приблизительно в 100,0 раз превышает ту же активность при втором рН. Первый рН может представлять собой аберрантный рН в диапазоне приблизительно 5,5-7,2 или приблизительно 6,2-6,8, тогда как второй рН может представлять собой нормальный физиологический рН в диапазоне приблизительно 7,2-7,6.

Д. Родительский полипептид

[172] Родительский полипептид может представлять собой полипептид дикого типа, включая неприродный полипептид, мутантный полипептид, полученный из полипептида дикого типа, такой как терапевтический полипептид, химерный полипептид, полученный из различных полипептидов дикого типа, или даже синтетический полипептид. Родительский полипептид может быть выбран из антител, ферментов, цитокинов, регуляторных белков, гормонов, рецепторов, лигандов, биоаналогов,

иммуномодуляторов, фактора роста и фрагментов данных полипептидов.

[173] Описание подходящих полипептидов дикого типа и путей, согласно которым их можно эволюционировать и отбирать для получения условно активных полипептидов, было описано в патенте США №8,709,755 В2.

5 [174] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения родительский полипептид может быть выбран из библиотеки полипептидов дикого типа или мутантных полипептидов, такой как библиотека бактериофагового дисплея. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения большое количество полипептидов-кандидатов экспрессируют в библиотеке бактериофагов, в частности,
10 при помощи метода экспонирования на поверхности. Проводят скрининг полипептидов-кандидатов из библиотеки в отношении подходящего родительского белка. Типичная библиотека бактериофагов может содержать бактериофаги, экспрессирующие тысячи или даже миллионы полипептидов-кандидатов в бактериальном хозяине. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения библиотека бактериофагов может
15 содержать множество бактериофагов.

[175] Для создания библиотеки бактериофагов обычно нитчатые бактериофаги, такие как нитчатый колифаг M13, генетическим образом модифицируют путем внедрения олигонуклеотидов, кодирующих полипептиды-кандидаты, в кодирующую
последовательность одного из белков оболочки бактериофага. Затем белки оболочки
20 бактериофага экспрессируют с полипептидами-кандидатами таким образом, что полипептиды-кандидаты экспонируются на поверхности частиц бактериофагов. Затем можно провести скрининг экспонированных полипептидов-кандидатов в отношении подходящего родительского полипептида.

[176] Одной распространенной методикой проведения скрининга в отношении
25 подходящего родительского полипептида является иммобилизация частиц бактериофага с желаемым полипептидом-кандидатом на подложке. Подложкой может служить пластиковый планшет, покрытый «приманкой», которая может связываться с желаемым полипептидом-кандидатом. Не способные к связыванию бактериофаговые частицы можно смыть с планшета. Бактериофаговые частицы, связывающиеся с планшетом (с
30 желаемым кандидатом) элюируют промыванием, и элюированные бактериофаговые частицы амплифицируют в бактерии. Последовательность или последовательности, кодирующие полипептид-кандидат в отобранных бактериофаговых частицах, затем можно определить при помощи секвенирования. Взаимоотношения между полипептидом-кандидатом и «приманкой» могут представлять собой, например,
35 взаимоотношение типа лиганд-рецептор или антиген-антитело.

[177] Другим распространенным методом проведения скрининга в отношении подходящего родительского полипептида является применение ферментативного анализа отдельных клонов бактериофагов для определения желаемой ферментативной активности, проявляемой полипептидами-кандидатами. В зависимости от специфичной
40 ферментативной активности специалист в данной области техники может разработать подходящий анализ для проведения скрининга в отношении родительского полипептида с желаемым уровнем ферментативной активности.

[178] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена библиотека бактериофагов в виде матрицы, так что каждый клон
45 бактериофага занимает определенное место в матрице. Такую матрицу можно получить на твердой подложке, например, мембране, планшете с агаром или планшете для микротитрования, на котором каждый клон бактериофага библиотеки размещен или прикреплен в определенном заданном положении на твердой подложке. В случае

планшетов с агаром такие планшеты, предпочтительно, содержат среды для роста бактерий, чтобы поддерживать рост бактерий. Когда матрица представлена на мембране, например, нитроцеллюлозной или нейлоновой мембране, культуру бактерий наносят на мембрану, и мембрану пропитывают питательной средой для роста. Кроме того, клоны бактериофагов также можно обеспечить на гранулах, и в данном случае один клон бактериофага можно прикрепить к одной грануле. В качестве альтернативы, каждый клон бактериофага можно обеспечить на кончике оптического волокна, и в данном случае волокно применяют для оптической передачи ультрафиолетового излучения от источника света.

[179] Типичная библиотека бактериофагов может содержать от 10^6 до 10^{10} бактериофагов, каждый из которых отличается белком оболочки (например, gp3 или gp8 в случае фага M13), несущим отличный полипептид-кандидат. Бактериальных хозяев для библиотеки бактериофагов можно отобрать из родов бактерий, включая, например, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* и *Escherichia*.

[180] Олигонуклеотиды, кодирующие полипептиды-кандидаты, могут представлять собой коллекцию кДНК, которые кодируют полипептиды дикого типа. Известны способы синтеза кДНК из биологического образца, при помощи которых можно осуществить экспрессию подходящего родительского полипептида. Любую генетическую информацию, которая проявляет физиологическую активность посредством транскриптов, можно собрать в качестве кДНК. При образовании кДНК необходимо синтезировать полноразмерные кДНК. Существует несколько способов, которые можно применять для синтеза полноразмерных кДНК. Например, подходящие способы включают способ, в котором используют кэп-связывающий белок из дрожжей или клеток Hela для мечения 5'-кэп-сайта (I. Edery et al., "An Efficient Strategy To Isolate Full-length cDNAs Based on a mRNA Cap Retention Procedure (CAPture)", *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, pages 3363-3371, 1995), и способ, в котором фосфаты неполных кДНК без 5-кэпа удаляют с применением щелочной фосфатазы, а затем все кДНК обрабатывают декэппирующим ферментом вируса табачной мозаики таким образом, что только полноразмерные кДНК содержат фосфаты (K. Maruyama et al., "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides", *Gene*, vol. 138, pages 171-174, 1995 и S. Kato et al., "Construction of a human full-length cDNA bank", *Gene*, vol. 150, pages 243-250, 1995).

[181] Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых родительский полипептид представляет собой антитело, библиотеку антител-кандидатов можно получить с применением рекомбинантных антител, полученных из полного репертуара антител организма. Генетическая информация, представляющая репертуар, собрана в большую коллекцию полных антител, скрининг которых можно провести в отношении подходящего родительского антитела с желаемой антигенсвязывающей активностью и/или одной или несколькими другими функциональными характеристиками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения из животных, иммунизированных антигеном, таких как иммунизированные человек, мышь или кролик, выделяют В-клетки. мРНК из выделенных В-клеток собирают и преобразуют в кДНК, которую затем секвенируют. Осуществляют сборку наиболее часто встречающихся фрагментов кДНК, кодирующих легкую цепь, и наиболее часто встречающихся фрагментов кДНК, кодирующих тяжелую цепь, в антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для получения антител-кандидатов осуществляют сборку 100 наиболее часто встречающихся фрагментов кДНК,

кодирующих легкую цепь, и 100 наиболее часто встречающихся фрагментов кДНК, кодирующих тяжелую цепь. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения наиболее часто встречающиеся фрагменты кДНК, которые кодируют только переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, собирают для получения фрагментов антитела, которые содержат только переменные области, но не константные области.

[182] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагменты кДНК, кодирующие переменные области тяжелых цепей IgG, собирают с наиболее часто встречающимися переменными областями IgK или легких цепей IgK. Полученные в результате сборки антитела содержат переменную область тяжелой цепи из IgG и переменную область легкой цепи из IgK или IgK.

[183] Затем осуществляют клонирование и экспрессию кДНК, кодирующих получаемые в результате сборки антитела, предпочтительно, в формате на основе планшетов. Активность связывания экспрессированных антител можно анализировать при помощи анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, твердофазный иммуноферментный анализ) на основе бусин, и можно провести отбор подходящего родительского антитела с помощью анализа ELISA. Экспрессию кДНК, кодирующих указанные получаемые в результате сборки антитела, можно также осуществить в библиотеке бактериофагового дисплея, скрининг которой можно затем провести в отношении одного или нескольких желаемых родительских антител при помощи любой из раскрытых в настоящем документе методик.

[184] Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых родительский полипептид представляет собой антитело, родительское антитело, предпочтительно, обладает по меньшей мере одной особой характеристикой, которая облегчает эволюционирование родительского антитела до условно активного антитела. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения родительское антитело может обладать сходной активностью связывания и/или характеристиками как при нормальном физиологическом условии, так и при aberrantном условии. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения родительское антитело отбирают на основании того, что оно обладает наиболее схожей активностью связывания и/или наиболее схожей комбинацией одной или нескольких характеристик как при нормальном физиологическом условии, так и при aberrantном условии. Например, если нормальное физиологическое условие и aberrantное условие представляют собой pH 7,4 и pH 6,0, соответственно, можно отобрать родительское антитело, которое обладает наиболее схожей активностью связывания при pH 7,4 и 6,0, по сравнению с антителом, обладающим менее схожей связывающей активностью при pH 7,4 и 6,0.

Е. Идентификация условно активных полипептидов

[185] После отбора родительского полипептида осуществляют эволюцию ДНК, кодирующей родительский полипептид, с применением подходящей методики мутагенеза для получения мутантных ДНК, экспрессию которых можно затем осуществить с получением мутантных полипептидов для скрининга с целью идентификации условно активного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эволюция может являться минимальной, например, в родительский полипептид вводят только небольшое количество мутаций для получения мутантного полипептида с желаемой условной активностью. Например, менее приблизительно 20 изменений, возможно, менее приблизительно 18 изменений, введенных на каждый сайт при помощи всесторонней позиционной эволюции (comprehensive positional evolution,

СРЕ), может быть достаточно для того, чтобы получить подходящий условно активный полипептид. Для всестороннего позиционного синтеза (comprehensive positional synthesis, CPS) комбинации из менее приблизительно 6 повышающих мутаций, или менее приблизительно 5 повышающих мутаций, или менее приблизительно 4 повышающих мутаций, или менее приблизительно 3 повышающих мутаций, или менее приблизительно 2 повышающих мутаций в родительском полипептиде может быть достаточно для получения желаемого условно активного полипептида.

[186] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этапы эволюционирования и экспрессии могут быть необязательными, когда библиотека полипептидов-кандидатов (например, бактериофаговая библиотека и/или библиотека рекомбинантных антител) является достаточно большой. Такая большая библиотека может содержать полипептид-кандидат с условно активными характеристиками (как с низкой активностью в анализе при нормальном физиологическом условии, так и с высокой активностью в анализе при аберрантном условии по сравнению с эталонным полипептидом, или с более низкой активностью в анализе при нормальном физиологическом условии, чем в анализе при аберрантном условии). Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения полипептиды-кандидаты в библиотеке подвергают этапу отбора для обнаружения условно активного полипептида, который является менее активным в анализе при нормальном физиологическом условии, чем тот же полипептид в анализе при аберрантном условии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения индивидуальным образом проводят анализ полипептидов-кандидатов в библиотеке при нормальном физиологическом условии и анализ при аберрантном условии совместно с эталонным полипептидом. Условно активный полипептид, который отбирают из библиотеки, представляет собой тот белок, который проявляет более низкую активность при нормальном физиологическом условии и более высокую активность того же полипептида при аберрантном условии, обе активности по сравнению с эталонным полипептидом. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения, если указанная библиотека достаточно велика, и в данной библиотеке уже существует полипептид-кандидат с условно активными характеристиками, эволюция родительского полипептида с целью обнаружения условно активного полипептида не требуется.

[187] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эталонный полипептид может не являться условно активным по той причине, что он обладает аналогичной или одинаковой активностью как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии. Эталонный полипептид представляет собой тот же тип полипептида, что и полипептиды-кандидаты в библиотеке, например, тот же тип фермента, цитокина, регуляторного белка, антитела, гормона или функционального пептида. Эталонный полипептид может также являться тем же типом тканевого активатора плазминогена, стрептокиназы, урокиназы, ренина, гиалуронидазы, пептида, связанного с геном кальцитонина (Calcitonin Gene Related Peptide, CGRP), субстанции P (SP), нейропептида Y (NPY), вазоактивного пептида кишечника (VTP), вазопрессина или ангиостатина. Например, когда библиотека содержит большое количество антител-кандидатов против антигена, эталонный полипептид представляет собой антитело против того же антигена с одинаковой или аналогичной активностью связывания с антигеном как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии.

[188] Вследствие этого согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды-кандидаты в библиотеке индивидуальным образом подвергают анализу

при нормальном физиологическом условии и анализу при аберрантном условии совместно с эталонным полипептидом. Из библиотеки выбирают условно активный полипептид, который проявляет как (а) снижение активности при нормальном физиологическом условии по сравнению с эталонным полипептидом, так и (б) повышение активности при аберрантном условии по сравнению с эталонным полипептидом.

Г. Способы получения условно активных полипептидов

[189] Для эволюции ДНК, которая кодирует родительский полипептид, применяют одну или несколько методик мутагенеза с целью создания мутантных ДНК; мутантные ДНК экспрессируют для получения мутантных полипептидов; и мутантные полипептиды подвергают скрининговому анализу при первом условии, которое может представлять собой нормальное физиологическое условие, и скрининговому анализу при втором условии, которое может представлять собой аберрантное условие. Условно активные полипептиды отбирают из тех мутантных полипептидов, которые проявляют как (а) снижение активности в анализе при первом условии по сравнению с родительским полипептидом, так и (б) увеличение активности в анализе при втором условии по сравнению с родительским полипептидом. Снижение активности при первом условии или нормальном физиологическом условии для условно активного полипептида может являться обратимым или необратимым.

[190] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, который следует эволюционировать, может представлять собой фрагмент полипептида дикого типа, фрагмент терапевтического полипептида или фрагмент антитела. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения родительский полипептид может представлять собой полипептид, который выбран из мутантных полипептидов, полученных способом мутагенеза, при этом полипептид отбирают для обеспечения желаемого свойства, такого как высокая активность связывания, высокий уровень экспрессии или гуманизация. Отобранный полипептид можно применять в качестве родительского полипептида, который следует эволюционировать в раскрытом в настоящем документе способе.

[191] Способы получения мутантных ДНК из ДНК, кодирующей родительский полипептид, были описаны в патенте США №8,709,755 В2.

[192] Эволюцию ДНК, кодирующей родительский полипептид, для получения мутантной ДНК можно проводить с применением точечных мутаций (замен, вставок и/или делеций) или мутации большого сегмента в ДНК. Согласно некоторым аспектам этап эволюционирования не изменяет активный сайт родительского полипептида, но вместо этого изменяет исключительно одну или несколько областей, прилежащих к активному сайту, и/или одну или несколько областей, удаленных от активного сайта.

[193] Согласно одному аспекту этап эволюционирования включает преобразование родительского полноразмерного антитела в одноцепочечные антитела. В данном случае, несмотря на то, что активные сайты, т.е. переменные области, в особенности, CDR, могут не содержать каких-либо мутаций относительно родительского антитела, контекст, в котором существует активный сайт, был изменен в результате устранения константных областей. В одном примере родительское полноразмерное антитело представляет собой антитело IgG, и мутантное антитело представляет собой одноцепочечное антитело, полученное из него.

[194] Согласно некоторым аспектам одноцепочечное антитело представляет собой биспецифичное антитело с двумя плечами, каждое из которых связывается с отличным эпитопом. Мутации на плече могут влиять на активность другого плеча. Таким образом,

этап эволюционирования может включать мутирование только одного плеча родительского полипептида, который представляет собой биспецифичное антитело. В одном примере длину одного плеча можно эволюционировать посредством укорачивания плеча в результате делеций или удлинения плеча в результате вставок.

5 В качестве альтернативы, на этапе эволюционирования можно эволюционировать оба плеча биспецифичного антитела в ходе одного этапа эволюционирования или последовательных этапов эволюционирования, необязательно со скринингом после каждого этапа.

10 [195] Согласно еще одному аспекту родительский полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела. На этапе эволюционирования можно мутировать Fc-область. Мутации в Fc-области могут представлять собой замены, вставки и/или делеций. Fc-область может быть укорочена в результате делеций фрагмента Fc-области или удлинена в результате вставки фрагмента в Fc-область.

15 [196] Согласно еще одному аспекту родительский полипептид содержит множество участков, определяющих комплементарность, перемежаемых каркасными участками. Такой родительский полипептид может представлять собой, например, вариабельную область антитела, легкую цепь или тяжелую цепь. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения на этапе эволюционирования можно мутировать исключительно каркасный участок или комбинацию участка, определяющего
20 комплементарность, и каркасного участка. Эволюционирование каркасного участка и участков, определяющих комплементарность, можно проводить в ходе одного этапа или нескольких последовательных этапов, необязательно со скринингом после каждого этапа.

25 [197] Согласно еще одному аспекту родительский полипептид содержит несколько областей за пределами активного сайта. Данные несколько областей можно последовательно мутировать в ходе множества этапов эволюционирования, необязательно со скринингом после одного или нескольких этапов эволюционирования. Например, на этапе эволюционирования можно эволюционировать одну из областей полипептида с последующим скринингом в отношении условно активного полипептида;
30 затем эволюционировать другую из областей полипептида с последующим скринингом в отношении условно активного полипептида; а затем эволюционировать третью область полипептида с последующим еще одним этапом скрининга в отношении условно активного полипептида.

35 [198] В некоторых обстоятельствах эволюция одной или нескольких областей родительского полипептида и/или мутанта условно активного полипептида, отличной от активного сайта (например, прилегающей области или удаленной области), может изменять активность активного сайта. Мутирование прилегающей области или удаленной области, отличной от активного сайта, может в некоторых обстоятельствах делать активный сайт мутантного полипептида более или менее активным, чем активный сайт
40 родительского полипептида, при конкретном условии. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения желаемой условной активности достигают или селективность улучшают в результате эволюционирования одной или нескольких областей родительского полипептида или мутантного полипептида, отличных от области, содержащей активный сайт.

45 [199] Согласно некоторым аспектам условно активный полипептид, полученный в результате эволюционирования области родительского полипептида, отличной от области, содержащей активный сайт, может позволить получить селективность, составляющую по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 5.

[200] Подходящие способы экспрессии полученных мутантных ДНК для получения мутантных полипептидов были описаны в патенте США №8,709,755 В2.

[201] Способы скрининга мутантных полипептидов для отбора условно активного полипептида были описаны в патенте США №8,709,755 В2.

5 [202] Условия анализа для скрининга и отбора условно активных полипептидов

[203] Первое условие и второе условие, или нормальное физиологическое условие и аберрантное условие, для анализов, применяемых на этапе скрининга, можно осуществить с применением условия, выбранного из температуры, рН, осмотического давления, осмоляльности, окислительного стресса, концентрации электролита, а также комбинаций двух или более таких условий. Например, нормальным физиологическим 10 условием для температуры может являться нормальная температура тела человека 37,0°C, в то время как аберрантным условием для температуры может являться температура, отличная от температуры 37,0°C, такая как температура в микроокружении опухоли, которая может быть на 1-2°C выше нормальной физиологической температуры. В другом примере нормальное физиологическое условие и аберрантное условие также 15 могут представлять собой нормальный физиологический рН в диапазоне 7,2-7,8 или 7,2-7,6 и аберрантный рН, такой как, например, в диапазоне 5,5-7,2, 6-7, 6,2-6,8, представленный в микроокружении опухоли.

[204] Анализы как при первом, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно проводить в среде 20 для анализа. Среда для анализа может представлять собой раствор, который может содержать, например, буфер, а также другие компоненты. Обычные буферы, которые можно применять в среде для анализа, включают цитратные буферы, такие как цитрат натрия, фосфатные буферы, бикарбонатные буферы, такие как буфер Кребса, фосфатный 25 буферный солевой раствор (ФБР), буфер Хэнкса, буфер Трис, буфер HEPES и т.д. Можно применять другие буферы, известные специалисту в данной области техники, которые являются подходящими для анализа. Данные буферы можно применять для имитации характеристики или компонента состава физиологической жидкости человека или животного, такой как плазма крови или лимфатическая жидкость.

30 [205] Растворы для анализа, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, могут содержать по меньшей мере один компонент, выбранный из неорганических соединений, ионов и органических молекул, предпочтительно, тех, которые обычно встречаются в физиологической жидкости млекопитающего, такого как человек или животное. Примеры таких компонентов включают питательные 35 компоненты и метаболиты, а также любые другие компоненты, которые можно обнаружить в физиологической жидкости. В настоящем изобретении предполагается, что данный компонент может являться или может не являться частью буферной системы. Например, растворы для анализа могут представлять собой ФБР с добавлением бикарбонат-иона, где бикарбонат не является частью ФБР. В качестве альтернативы, 40 бикарбонат-ион является компонентом буфера Кребса.

[206] Компонент может присутствовать в обоих растворах для анализа (для первого и второго условий) в по существу одинаковой концентрации, при этом два раствора для анализа отличаются другим аспектом, таким как рН, температура, концентрации электролитов или осмотическое давление. Таким образом, компонент используется в 45 качестве константы вместо отличия между двумя условиями первого и второго условия, или нормальным физиологическим условием и аберрантным условием.

[207] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент присутствует в обоих растворах для анализа в концентрации, близкой к нормальной

физиологической концентрации компонента у млекопитающих, в особенности, у человека, или в той же концентрации.

[208] Неорганические соединения или ионы можно выбрать из одного или нескольких из борной кислоты, хлорида кальция, нитрата кальция, фосфата диаммония, сульфата магния, фосфата моноаммония, фосфата монокалия, хлорида калия, сульфата калия, сульфата меди, сульфата железа, сульфата марганца, сульфата цинка, сульфата магния, нитрата кальция, хелатов кальция, меди, железа, марганца и цинка, молибдата аммония, сульфата аммония, карбоната кальция, фосфата магния, бикарбоната калия, нитрата калия, соляной кислоты, диоксида углерода, серной кислоты, фосфорной кислоты, угольной кислоты, мочевой кислоты, хлористого водорода, мочевины, иона фосфора, иона серы, хлорид-иона, иона магния, иона натрия, иона калия, иона аммония, иона железа, иона цинка и иона меди.

[209] Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых неорганических соединений включают: мочевую кислоту в диапазоне концентраций 2-7,0 мг/дл, ион кальция в диапазоне концентраций 8,2-11,6 мг/дл, хлорид-ион в диапазоне концентраций 355-381 мг/дл, ион железа в диапазоне концентраций 0,028-0,210 мг/дл, ион калия в диапазоне концентраций 12,1-25,4 мг/дл, ион натрия в диапазоне концентраций 300-330 мг/дл, карбоновую кислоту в диапазоне концентраций 15-30 мМ, ион цитрата в концентрации приблизительно 80 мкМ, гистидин-ион в диапазоне концентраций 0,05-2,6 мМ, гистамин в диапазоне концентраций 0,3-1 мкМ, НАРТ-ион (гидрированный аденозинтрифосфат) в диапазоне концентраций 1-20 мкМ, и HADP-ион в диапазоне концентраций 1-20 мкМ.

[210] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ион, присутствующий в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, выбирают из гидроксид-иона, галогенид-иона (хлорида, бромид, иодида), оксигалогенид-иона, сульфат-иона, иона магния, иона кальция, бисульфат-иона, карбонат-иона, бикарбонат-иона, сульфонат-иона, оксигалогенид-иона, нитрат-иона, нитрит-иона, фосфат-иона, гидрофосфат-иона, дигидрофосфат-иона, персульфат-иона, моноперсульфат-иона, борат-иона, иона аммония или органического иона, такого как карбоксилат-ион, фенолят-иона, сульфонат-иона (органосульфата, такого как метилсульфат), ванадат-иона, вольфрамат-иона, борат-иона, органоборонат-иона, цитрат-иона, оксалат-иона, ацетат-иона, пентаборат-иона, гистидин-иона и фенолят-иона.

[211] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать, например, из аминокислот, таких как гистидин, аланин, изолейцин, аргинин, лейцин, аспарагин, лизин, аспарагиновая кислота, метионин, цистеин, фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин, глутамин, триптофан, глицин, валин, пирролизин, пролин, селеноцистеин, серин, тирозин, и из их смесей.

[212] Примеры нормальной физиологической концентрации некоторых аминокислот включают: аланин в концентрации $3,97 \pm 0,70$ мг/дл, аргинин в концентрации $2,34 \pm 0,62$ мг/дл, глутаминовую кислоту в концентрации $3,41 \pm 1,39$ мг/дл, глутамин в концентрации $5,77 \pm 1,55$ мг/дл, глицин в концентрации $1,77 \pm 0,26$ мг/дл, гистидин в концентрации $1,42 \pm 0,18$ мг/дл, изолейцин в концентрации $1,60 \pm 0,31$ мг/дл, лейцин в концентрации $1,91 \pm 0,34$ мг/дл, лизин в концентрации $2,95 \pm 0,42$ мг/дл, метионин в концентрации $0,85 \pm 0,46$ мг/дл, фенилаланин в концентрации $1,38 \pm 0,32$ мг/дл, треонин в концентрации $2,02 \pm 6,45$

мг/дл, триптофан в концентрации $1,08 \pm 0,21$ мг/дл, тирозин в концентрации $1,48 \pm 0,37$ мг/дл и валин в концентрации $2,83 \pm 0,34$ мг/дл.

[213] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из небелковых азотсодержащих соединений, таких как креатин, креатинин, гуанидиноуксусная кислота, мочева кислота, аллантаин, аденозин, мочевины, аммиак и холин. Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых из данных соединений включают: креатин в концентрации $1,07 \pm 0,76$ мг/дл, креатинин в концентрации от 0,9 до 1,65 мг/дл, гуанидиноуксусную кислоту в концентрации $0,26 \pm 0,24$ мг/дл, мочевую кислоту в концентрации $4,0 \pm 2,9$ мг/дл, аллантаин в концентрации от 0,3 до 0,6 мг/дл, аденозин в концентрации $1,09 \pm 0,385$ мг/дл, мочевины в концентрации $27,1 \pm 4,5$ мг/дл и холин в концентрации от 0,3 до 1,5 мг/дл.

[214] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из органических кислот, таких как лимонная кислота, α -кетоглутаровая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, фумаровая кислота, ацетоуксусная кислота, β -гидроксимасляная кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, α -кетоновая кислота, уксусная кислота и летучие жирные кислоты. Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых из данных органических кислот включают: лимонную кислоту в концентрации $2,5 \pm 1,9$ мг/дл, α -кетоглутаровую кислоту в концентрации 0,8 мг/дл, янтарную кислоту в концентрации 0,5 мг/дл, яблочную кислоту в концентрации $0,46 \pm 0,24$ мг/дл, ацетоуксусную кислоту в концентрации от 0,8 до 2,8 мг/дл, β -гидроксимасляную кислоту в концентрации $0,5 \pm 0,3$ мг/дл, молочную кислоту в концентрации от 8 до 17 мг/дл, пировиноградную кислоту в концентрации $1,0 \pm 0,77$ мг/дл, α -кетоновую кислоту в концентрации от 0,6 до 2,1 мг/дл, летучие жирные кислоты в концентрации 1,8 мг/дл.

[215] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из сахаров (углеводов), таких как глюкоза, пентоза, гексоза, ксилоза, рибоза, манноза и галактоза, а также дисахаридов, включая лактозу, GlcNAc β 1-3Gal, Gal α 1-4Gal, Man α 1-2Man, GalNAc β 1-3Gal и O-, N-, C- или S-гликозиды. Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых из данных сахаров включают: глюкозу в концентрации 83 ± 4 мг/дл, полисахариды в концентрации 102 ± 73 мг/дл (в виде гексозы), глюкозамин в концентрации 77-63 мг/дл, гексуронаты в концентрации от 0,4 до 1,4 мг/дл (в виде глюкуроновой кислоты) и пентозу в концентрации $2,55 \pm 0,37$ мг/дл.

[216] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из жиров или их производных, таких как холестерол, лецитин, цефалин, сфингомиелин и желчная кислота. Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых из данных соединений включают: свободный холестерол в концентрации от 40 до 70 мг/дл, лецитин в концентрации от 100 до 200 мг/дл, цефалин в концентрации от 0 до 30 мг/дл, сфингомиелин в концентрации от 10 до 30 мг/дл и желчные кислоты в концентрации от 0,2 до 0,3 мг/дл (в виде желчной кислоты).

[217] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом

условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из белков, таких как фибриноген, антигемофильный глобулин, иммунный γ -глобулин, иммунные эуглобулины, изоагглютинины, β -псевдоглобулин, гликопротеины, липопротеины и альбумин. Например, нормальная физиологическая концентрация альбумина в сыворотке млекопитающих составляет 3,5-5,0 г/дл. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения альбумин представляет собой бычий сывороточный альбумин.

[218] Органические соединения, присутствующие в растворах для анализа как при первом условии, так и при втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии, можно выбрать из витаминов, таких как витамин А, каротин, витамин Е, аскорбиновая кислота, тиамин, инозитол, фолиевая кислота, биотин, пантотеновая кислота, рибофлавин. Примеры нормальных физиологических концентраций некоторых из данных витаминов включают: витамин А в концентрации от 0,019 до 0,036 мг/дл, витамин Е в концентрации от 0,90 до 1,59 мг/дл, инозитол в концентрации от 0,42 до 0,76 мг/дл, фолиевую кислоту в концентрации от 0,00162 до 0,00195 мг/дл и биотин в концентрации от 0,00095 до 0,00166 мг/дл.

[219] Концентрация неорганического соединения, иона или органической молекулы в растворах для анализа (для анализа при первом условии и втором условии, или как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии) может находиться в пределах нормального диапазона физиологической концентрации неорганического соединения, иона или органической молекулы в сыворотке крови человека или животного. Однако также можно применять концентрацию вне нормального физиологического диапазона. Например, величина нормального диапазона в сыворотке человека для иона магния составляет 1,7-2,2 мг/дл, а для иона кальция составляет 8,5-10,2 мг/дл. Концентрация иона магния в растворах для анализа может составлять от приблизительно 0,17 мг/дл до приблизительно 11 мг/дл. Концентрация иона кальция в растворах для анализа может составлять от приблизительно 0,85 мг/дл до приблизительно 51 мг/дл. Как правило, концентрация неорганического соединения, иона или органической молекулы в растворах для анализа может составлять всего лишь 5%, или 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80% от нормальной физиологической концентрации неорганического соединения, иона или органической молекулы в сыворотке человека, или может в 1,5 раза, или в 2 раза, или в 3 раза, или в 4 раза, или в 5 раз, или в 7 раз, или в 9 раз или в 10 раз или даже в 20 раз превышать нормальную физиологическую концентрацию неорганического соединения, иона или органической молекулы в сыворотке человека. Различные компоненты растворов для анализа можно применять при различных уровнях концентрации по сравнению с их соответствующими нормальными физиологическими концентрациями.

[220] Анализы при первом условии и втором условии, или при нормальном физиологическом условии и аберрантном условии применяют для измерения активности мутантных полипептидов. В ходе анализов в растворах для анализа присутствуют как мутантный полипептид, так и его партнер по связыванию. Связь между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию может быть, например, вида антитело-антиген, лиганд-рецептор, фермент-субстрат или гормон-рецептор. Для того чтобы мутантный полипептид проявил свою активность, мутантный полипептид должен быть способен вступать в контакт со своим партнером по связыванию и связываться с ним. Затем мутантный полипептид проявляет активность в отношении своего партнера по связыванию, и ее измеряют после связывания мутантного полипептида и его партнера по связыванию.

[221] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяемые в анализе ионы могут функционировать при образовании мостика между подвергаемым скринингу мутантным полипептидом и его партнером по связыванию, в частности, включая заряженные аминокислотные остатки. Таким образом, ион может
 5 быть способен связываться как с мутантным полипептидом, так и с его партнером по связыванию посредством водородных связей и/или ионных связей. Это может способствовать связыванию между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию, тем самым позволяя иону достигать участка, который может быть труднодоступным для большой молекулы (мутантного полипептида или его партнера
 10 по связыванию). В некоторых случаях ион в растворах для анализа может увеличивать вероятность того, что мутантный полипептид и его партнер по связыванию свяжутся друг с другом. Кроме того, ион может дополнительно или в качестве альтернативы способствовать связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию посредством связывания с большей молекулой (мутантным полипептидом или его
 15 партнером по связыванию). Данное связывание может изменить конформацию большой молекулы и/или способствовать тому, что большая молекула остается в определенной конформации, которая облегчает связывание с ее партнером по связыванию.

[222] Было установлено, что ионы могут способствовать связыванию между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию, возможно, путем
 20 образования ионных связей с мутантным полипептидом и его партнером по связыванию. Таким образом, скрининг может быть намного более эффективным, и можно идентифицировать больше попаданий (условно активных полипептидов-кандидатов) по сравнению с теми же анализами, проведенными без применения иона. Подходящие ионы можно выбрать из иона магния, сульфат-иона, бисульфат-иона, карбонат-иона,
 25 цитрат-иона, НАРТ-иона, НАДФ-иона, бикарбонат-иона, нитрат-иона, нитрит-иона, фосфат-иона, гидрофосфат-иона, дигидрофосфат-иона, персульфат-иона, моноперсульфат-иона, борат-иона, лактат-иона, цитрат-иона, гистидин-иона, гистамин-иона и иона аммония.

[223] Было обнаружено, что ионы служат для содействия связыванию мутантного
 30 полипептида с его партнером по связыванию при pH приблизительно равном pKa иона. Такие ионы, предпочтительно, относительно малы по отношению к размеру мутантных полипептидов.

[224] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, когда аберрантное условие представляет собой pH, отличающийся от нормального
 35 физиологического pH при нормальном физиологическом условии, ионы, подходящие для увеличения числа попаданий для условно активных полипептидов-кандидатов, можно выбрать из ионов, которые характеризуются pKa, близким к аберрантному pH, которое исследуют в данном анализе. Например, величина pKa иона может отличаться на до 2 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 1 единицы pH от
 40 аберрантного pH, может отличаться на до 0,8 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 0,6 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 0,5 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 0,4 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 0,3 единиц pH от аберрантного pH, может отличаться на до 0,2 единиц pH от аберрантного pH, или может отличаться на до 0,1 единицы pH от
 45 аберрантного pH.

[225] Иллюстративные pKa ионов, подходящих в настоящем изобретении, pKa которых могут в незначительной степени меняться при различных температурах, являются следующими: ион аммония, pKa которого составляет приблизительно 9,24,

дигидрофосфат-ион, рКа которого составляет приблизительно 7,2, ион уксусной кислоты, рКа которого составляет приблизительно 4,76, гистидин, рКа которого составляет приблизительно 6,04, бикарбонат-ион, рКа которого составляет приблизительно 6,4, цитрат-ион, рКа которого составляет 6,4, лактат-ион, рКа которого составляет приблизительно 3,86, гистамин, рКа которого составляет приблизительно 6,9, НАТР, рКа которого составляет 6,95 ($\text{НАТР3} \rightleftharpoons \text{АТР4} + \text{Н}^+$), и НАДР, рКа которого составляет 6,88 ($\text{НАДР3} \rightleftharpoons \text{АДР4} + \text{Н}^+$).

[226] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения анализ и отбор условно активных полипептидов осуществляют в присутствии бисульфида. Бисульфид имеет рКа 7,05. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в анализах, представляющих нормальные и aberrantные физиологические условия, можно использовать различные концентрации бисульфида. В качестве альтернативы, среда для анализа как при нормальном физиологическом условии, так и при aberrantном условии содержит приблизительно одинаковую концентрацию бисульфида, а также имеет место некоторое различие в значении конкретного условия, например, анализ можно проводить при различных значениях рН. Концентрация бисульфида, применяемая в анализе, может составлять от 1 мМ до 100 мМ. Предпочтительно, среда для анализа содержит концентрацию бисульфида от 2 до 500 нМ, или от 3 до 200 нМ, или от 5 до 100 нМ. Согласно некоторому аспекту концентрация бисульфида может составлять от 1 мМ до 20 мМ, или от 2 мМ до 10 мМ. Анализы, проводимые в присутствии бисульфида, известны.

[227] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения, когда известен рН для aberrantного условия (т.е. aberrantный рН), ион, подходящий для увеличения попаданий для условно активных полипептидов-кандидатов, можно выбрать из ионов, рКа которых совпадает с aberrantным рН или близко к нему, например, ионы-кандидаты могут характеризоваться рКа, которая отличается на до 4 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 3 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 2 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 1 единицы рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,8 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,6 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,5 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,4 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,3 единиц рН от aberrantного рН, которая отличается на до 0,2 единицы рН от aberrantного рН, или которая отличается на до 0,1 единицы рН от aberrantного рН.

[228] Как было указано выше, ион наиболее эффективно способствует связыванию между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию при рН, который совпадает или близок к рКа указанного иона. Например, было обнаружено, что в растворе для анализа со значением рН 7,2-7,6 бикарбонат-ион (обладающий значением рКа приблизительно 6,4) не очень эффективен при содействии связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию. Когда значение рН в растворе для анализа уменьшалось до 6,7 и далее до приблизительно 6,0, бикарбонат-ион становился все более эффективным при содействии связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию. В результате в данном исследовании можно идентифицировать большее число попаданий при значении рН 6,0 по сравнению с анализом при значении рН 7,2-7,6. Аналогичным образом, гистидин не очень эффективен при содействии связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию при значении рН 7,4. Когда рН раствора для анализа понижается до 6,7 и далее до приблизительно 6,0, гистидин становится все более эффективным при содействии

связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию, также способствуя идентификации большего числа попаданий в диапазоне значений рН, например, приблизительно 6,2-6,4.

[229] Неожиданным образом в настоящем изобретении было обнаружено, что, когда рН растворов для анализа для нормального физиологического условия (т.е. нормальный физиологический рН) и аберрантного условия (т.е. аберрантный рН) различен, ион, рКа которого находится в диапазоне от приблизительно средней величины нормального физиологического значения рН и аберрантного рН до приблизительно аберрантного рН, может значимым образом способствовать связыванию подвергнутого скринингу мутантного полипептида с его партнером по связыванию. В результате скрининговый анализ является намного более эффективным при образовании большего числа попаданий или условных полипептидов-кандидатов с высокой активностью при аберрантном условии.

[230] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рКа может даже отличаться по меньшей мере на одну единицу рН от аберрантного рН. Когда аберрантный рН является кислым рН, рКа подходящего иона может находиться в диапазоне от (аберрантный рН -1) до средней величины между аберрантным рН и нормальным физиологическим рН. Когда аберрантный рН является щелочным рН, рКа подходящего иона может находиться в диапазоне от (аберрантный рН +1) до средней величины между аберрантным рН и нормальным физиологическим рН. Ионы можно выбрать из тех, которые описаны в настоящей заявке. Однако также можно применять еще множество ионов, которые явно не описаны в настоящей заявке. Понятно, что после выбора аберрантного рН и нормального физиологического рН для проведения скрининговых анализов специалист в данной области техники может применять руководящие принципы настоящего изобретения для осуществления выбора любого иона с подходящим рКа для повышения эффективности скрининга при идентификации большего числа попаданий с высокой активностью при аберрантном условии.

[231] Например, когда для примера скрининга аберрантный рН составляет 8,4, а нормальный физиологический рН составляет 7,4, для проведения скрининга можно применять любой ион, рКа которого находится в диапазоне от приблизительно 7,9 (средняя величина) до 9,4 (т.е. $8,4 + 1$). Некоторые ионы с находящимися в данном диапазоне рКа включают ионы, полученные из трицина (рКа 8,05), гидразина (рКа 8,1), бицина (рКа 8,26), N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(4-бутансульфоновой кислоты) (рКа 8,3), N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновой кислоты (рКа 8,4), таурина (рКа 9,06). В другом примере, когда для примера скрининга аберрантный рН равен 6, а нормальный физиологический рН составляет 7,4, для проведения скрининга можно применять любой ион, рКа которого находится в диапазоне от приблизительно 5 (т.е. $6 - 1$) до 6,7 (средняя величина). Некоторые ионы с находящимися в данном диапазоне рКа включают ионы, полученные из малата (рКа 5,13), пиридина (рКа 5,23), пиперазина (рКа 5,33), какодилата (рКа 6,27), сукцината (рКа 5,64), 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (рКа 6,10), цитрата (рКа 6,4), гистидина (рКа 6,04) и бис-трис (6,46). Специалист в данной области техники сможет проконсультироваться с большим количеством химических руководств и пособий для идентификации известных химических соединений, которые можно преобразовать в ионы, рКа которых находится в указанных диапазонах, включая как неорганические химические соединения, так и органические химические соединения. Среди химических соединений с подходящим рКа могут быть предпочтительными соединения с меньшей молекулярной массой.

[232] Следовательно, в настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что получение условно активных полипептидов, которых в конечном счете идентифицируют, зависит не только от получения правильных мутантов полипептида, но также от применения в растворах для анализа иона с подходящим рКа. Настоящее изобретение предполагает, что в дополнение к получению большой библиотеки мутантных полипептидов (например, посредством CPE и CPS), необходимо также предпринять усилия для поиска подходящего иона (с соответствующим рКа) для применения в растворах для анализа, поскольку ион может способствовать проведению отбора из большой библиотеки мутантов с высокой активностью. Кроме того, предполагается, что без подходящего иона скрининг является менее эффективным, и вероятность нахождения мутантов с высокой активностью снижается. Следовательно, для получения такого же количества мутантов с высокой активностью без подходящего иона может потребоваться проведение нескольких циклов скрининга.

[233] Ион в растворах для анализа можно образовать *in situ* из компонента раствора для анализа, или он может содержаться непосредственно в растворе для анализа. Например, CO_2 из воздуха может растворяться в растворе для анализа для получения карбонат- и бикарбонат-ионов. В другом примере в раствор для анализа можно добавить раствор дигидрофосфата натрия, чтобы получить дигидрофосфат-ионы.

[234] Концентрация данного компонента в растворах для анализа (как для анализа при первом или нормальном физиологическом условии, так и для анализа при втором или аберрантном условии) может быть одинаковой или по существу одинаковой, как и концентрация того же компонента, которую обычно обнаруживают в природной физиологической жидкости млекопитающего, такого как человек. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения концентрация компонента может быть выше, особенно тогда, когда компонент представляет собой ион, который может функционировать для содействия связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию, поскольку было обнаружено, что более высокая концентрация такого иона может образовывать ионные связи с мутантным полипептидом и его партнером по связыванию, практическим образом способствовать связыванию и увеличивать вероятность обнаружения большего числа попаданий или условно активных полипептидов-кандидатов.

[235] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения концентрация иона в растворах для анализа может положительно коррелировать с вероятностью обнаружения большего числа попаданий с применением анализа, в особенности, при использовании концентраций, превышающих нормальные физиологические концентрации. Например, концентрация бикарбонат-иона в сыворотке человека составляет приблизительно 15-30 мМ. В одном примере, когда концентрация бикарбонат-иона в растворах для анализа увеличивалась с 3 мМ до 10 мМ, с 20 мМ до 30 мМ, с 50 мМ и до 100 мМ, число попаданий в анализе также увеличивалось с каждым увеличением концентрации бикарбоната. В связи с этим в растворах для анализа можно использовать концентрации бикарбоната, составляющие от приблизительно 3 мМ до приблизительно 200 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 25 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 35 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ.

[236] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения концентрация цитрата в растворах для анализа может составлять от приблизительно 30 мкМ до приблизительно 120 мкМ, или от приблизительно 40 мкМ до приблизительно 110 мкМ, или от приблизительно 50 мкМ до приблизительно 110 мкМ, или от приблизительно 60 мкМ до приблизительно 100 мкМ, или от приблизительно мкМ до приблизительно 90 мкМ, или приблизительно мкМ.

[237] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нормальное физиологическое условие представляет собой нормальный физиологический pH в диапазоне 7,2-7,6, а aberrантное условие представляет собой aberrантный pH в диапазоне 5,5-7,2, 6-7 или 6,2-6,8. Раствор для анализа для проведения анализа при нормальном физиологическом условии характеризуется нормальным физиологическим pH и содержит 50 мМ бикарбонат-иона. Поскольку pKa бикарбонат-иона составляет приблизительно 6,4, бикарбонат-ион может способствовать связыванию между мутантными полипептидами и их партнерами по связыванию при aberrантном pH 6,0-6,4, таком как pH 6,0 или 6,2.

[238] Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения нормальное физиологическое условие представляет собой нормальный физиологический pH в диапазоне 7,2-7,6, а aberrантное условие представляет собой aberrантный pH в диапазоне 5,5-7,2, 6-7 или 6,2-6,8. Раствор для анализа для проведения анализа при нормальном физиологическом условии характеризуется нормальным физиологическим pH и содержит 80 мкМ цитрат-иона. Раствор для анализа для проведения анализа при aberrантном условии характеризуется aberrантным pH и содержит 80 мкМ цитрат-иона. Поскольку pKa цитрат-иона составляет 6,4, цитрат-ион может способствовать связыванию между мутантными полипептидами и партнером по связыванию в растворе для анализа при aberrантном условии с pH 6,0-6,4. Вследствие этого можно идентифицировать большее количество условно активных полипептидов-кандидатов, которые обладают более высокой активностью связывания при условии pH 6,0-6,4 и более низкой активностью при условиях pH 7,2-7,8. Другие ионы, включая ацетат, гистидин, бикарбонат, НАТР и НАДР, функционируют аналогичным образом, что позволяет проводить анализ раствора, содержащего ион, для эффективного скрининга в отношении мутантных полипептидов с более высокой активностью связывания при pH, приблизительно равном pKa иона, и с более низкой активностью связывания при pH, который отличается от pKa иона (например, нормальный физиологический pH).

[239] Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения нормальное физиологическое условие представляет собой нормальную физиологическую температуру при 37°C, а aberrантное условие представляет собой aberrантную температуру при 38-39°C (температура в микроокружениях некоторых опухолей). Раствор для анализа для проведения анализа при нормальном физиологическом условии характеризуется нормальной физиологической температурой и содержит 20 мМ бикарбонат-иона. Раствор для анализа для проведения анализа при aberrантном условии характеризуется aberrантной температурой и содержит 20 мМ бикарбонат-иона.

[240] Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения нормальное физиологическое условие представляет собой конкретную концентрацию электролита в нормальной сыворотке человека, а aberrантное условие представляет собой концентрацию того же электролита в другой, aberrантной концентрации, которая может присутствовать в различных месторасположениях животного или человека или может являться результатом состояния животного или человека, которое изменяет

нормальную физиологическую концентрацию электролита в сыворотке человека.

[241] На связывание между мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию также можно оказывать воздействие рядом других способов. Как правило, данное воздействие оказывают посредством добавления в растворы для анализа одного или нескольких дополнительных компонентов. Данные дополнительные компоненты можно разработать для взаимодействия либо с мутантным полипептидом, либо с партнером по связыванию, или с ними обоими. Кроме того, данные дополнительные компоненты могут применять комбинации двух или более взаимодействий, а также комбинации двух или более типов взаимодействий для воздействия на связывание.

[242] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения взаимодействие связывания, представляющее интерес, осуществляется между антителом и антигеном. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения в растворы для анализа можно добавить один или несколько дополнительных компонентов, чтобы оказывать воздействие на антитело, антиген или на них оба. Таким образом, можно усилить желаемое взаимодействие связывания.

[243] Помимо ионов, которые могут образовывать ионные связи с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию для содействия связыванию между мутантным полипептидом и партнером по связыванию, в настоящее изобретение также включены другие компоненты, которые можно использовать для содействия связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения применяют молекулы, которые могут образовывать водородные связи с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения можно применять молекулы, которые способны к гидрофобному взаимодействию с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения подразумеваются молекулы, которые способны к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию.

[244] В настоящем документе термин «водородная связь» относится к относительно слабому нековалентному взаимодействию между водородом, ковалентно связанным с электроотрицательным атомом, таким как углерод, азот, кислород, сера, хлор или фтор (донор водородной связи), с неподеленной электронной парой атома донора электронов, такого как азот, кислород, сера, хлор или фтор (акцептор водородной связи).

[245] Компоненты, способные к образованию водородной связи с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию, включают органические молекулы, а также неорганические молекулы с полярной связью. Мутантные полипептиды и/или партнеры по связыванию для мутантных полипептидов, как правило, содержат аминокислоты, которые могут образовывать водородные связи. Подходящие аминокислоты содержат боковую цепь с полярной группой, которая способна образовывать водородную связь. Неограничивающие примеры подходящих аминокислот включают глутамин (Gln), глутаминовую кислоту (Glu), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновую кислоту (Asp), лизин (Lys), гистидин (His), серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), цистеин (Cys), метионин (Met) и триптофан (Trp).

[246] Данные аминокислоты могут функционировать в качестве как доноров водорода, так и акцепторов водорода. Например, атом кислорода в группе -ОН, такой как группа, которую можно обнаружить в Ser, Thr и Tyr, атом кислорода в группе -C=O, такой как группа, которую можно обнаружить в Glu и Asp, атом серы в группе -SH

или -SC-, такой как группа, которую можно обнаружить в Cys и Met, атом азота в группе -NH₃⁺, такой как группа, которую можно обнаружить в Lys и Arg, и атом азота в группе -NH-, такой как группа, которую можно обнаружить в Trp, His и Arg, могут функционировать в качестве акцептора водорода. Кроме того, группы в данном списке, содержащие атом водорода (например, -OH, -SH, NH₃⁺ и -NH-), могут функционировать в качестве донора водорода.

[247] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остов мутантного полипептида и/или его партнера по связыванию также может участвовать в образовании одной или нескольких водородных связей. Например, остов может содержать повторяющуюся структуру -(C=O)-NH-, такую как в пептидных связях. Атомы кислорода и азота в данной структуре могут функционировать в качестве акцепторов водорода, в то время как атом водорода может участвовать в образовании водородной связи.

[248] Неорганические соединения, которые содержат по меньшей мере одну полярную связь, содержащую атом водорода или кислорода, который можно применять для образования водородных связей, могут включать, например, H₂O, NH₃, H₂O₂, гидразин, карбонаты, сульфаты и фосфаты. Органические соединения, такие как спирты; фенолы; тиолы; алифатические амины, амиды; эпоксиды, карбоновые кислоты; кетоны, альдегиды, простые эфиры, сложные эфиры, органохлориды и органофториды. Соединения, которые могут образовывать водородные связи, хорошо известны в химической литературе, например, такие как соединения, которые обсуждаются в руководстве "The Nature of the Chemical Bond" by Linus Pauling, Cornell University Press, 1940, страницы 284-334.

[249] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спирты могут включать метанол, этанол, пропанол, изопропанол, бутанол, пентанол, 1-гексанол, 2-октанол, 1-деканол, циклогексанол и высшие спирты; диолы, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерол, диэтиленгликоль и полиалкиленгликоли. Подходящие фенолы включают гидрохинон, резорцинол, катехол, фенол, о-, м- и *p*-крезол, тимол, альфа- и бета-нафтол, пирогаллол, гваякол и флорглюцинол. Подходящие тиолы включают метантиол, этантиол, 1-пропантиол, 2-пропантиол, бутантиол, трет-бутилмеркаптан, пентантиолы, гексантиол, тиофенол, димеркаптоянтарную кислоту, 2-меркаптоэтанол и 2-меркаптоиндол. Подходящие амины включают метиламин, этиламин, пропиламин, изопропиламин, анилин, диметиламин и метилэтиламин, триметиламин, азиридин, пиперидин, N-метилпиперидин, бензидин, циклогексиламин, этилендиамин, гексаметилендиамин, о- м- и *p*-толуидин и N-фенилпиперидин. Подходящие амиды включают этанамид, N,N-диметилацетамид, N,N-диметилформамид, N,N-диметилметоксиацетамид и N-метил-N-п-цианоэтилформамид. Эпоксиды могут включать этиленоксид, пропиленоксид, трет-бутилгидропероксид, оксид стирола, эпоксид-глицидол, оксид циклогексена, ди-трет-бутилпероксид, гидропероксид кумола или гидропероксид этилбензола, изобутиленоксид и 1,2-эпксиоктан. Карбоновые кислоты могут включать терефталевую кислоту, изофталевую кислоту, фталевую кислоту, салициловую кислоту, бензойную кислоту, уксусную кислоту, лауриновую кислоту, адипиновую кислоту, молочную кислоту, лимонную кислоту, акриловую кислоту, глицин, гексагидробензойную кислоту, о-, м- и *p*-толуиловые кислоты, никотиновую кислоту, изоникотиновую кислоту и парааминобензойную кислоту. Кетоны могут включать ацетон, 3-пропанон, бутанон, пентанон, метилэтилкетон, диизобутилкетон, этилбутилкетон, метилизобутилкетон, метил-трет-бутилкетон, циклогексанон, ацетон, метилэтилкетон, метилпропилкетон,

метилбутилкетон, метиламилкетон, метилгексилкетон, диэтилкетон, этилбутилкетон, дипропилкетон, диизобутилкетон, диацетоновый спирт, форон, изофорон, циклогексанон, метилциклогексанон и ацетофенон. Альдегиды могут включать формальдегид, ацетальдегид, пропиональдегид, бутиральдегид, бензальдегид, 5 циннамальдегид, собутиральдегид, валериановый альдегид, октальдегид, бензальдегид, циннамальдегид, циклогексанон, салицилальдегид и фурфурол. Сложные эфиры включают этилацетат, метилацетат, этилформиат, бутилацетат, этиллактат, этилбутират, пропилацетат, этилформиат, пропилформиат, бутилформиат, амилформиат, метилацетат, этилацетат, пропилацетат, бутилацетат, амилацетат, метилизоциамилацетат, 10 метоксибутилацетат, гексилацетат, циклогексилацетат, бензилацетат, метилпропионат, этилпропионат, бутилпропионат, амилпропионат, метилбутират, этилбутират, бутилбутират, амилбутират, метилацетоацетат и этилацетоацетат. Простые эфиры, которые можно применять в настоящем изобретении, включают диметиловый эфир, метилэтиловый эфир, диэтиловый эфир, метилпропиловый эфир и диметоксиэтан. 15 Простые эфиры могут являться циклическими, такими как этиленоксид, тетрагидрофуран и диоксан.

[250] Органохлориды включают хлороформ, пентахлорэтан, дихлорметан, трихлорметан, тетрахлорид углерода, тетрахлорметан, тетрахлорэтан, пентахлорэтан, трихлорэтилен, тетрахлорэтилен и этилендихлорид. Органофториды могут включать 20 фторметан, дифторметан, трифторметан, трифторэтан, тетрафторэтан, пентафторэтан, дифторпропан, трифторпропан, тетрафторпропан, пентафторпропан, гексафторпропан и гептафторпропан.

[251] По прочности связи водородные связи можно разделить на: сильные, умеренные или слабые водородные связи (Jeffrey, George A.; An introduction to hydrogen bonding, 25 Oxford University Press, 1997). В сильных водородных связях расстояние донор-акцептор составляет 2,2-2,5 Å, а величины энергий находятся в диапазоне 14-40 ккал/моль. В умеренных водородных связях расстояние донор-акцептор составляет 2,5-3,2 Å, а величины энергий находятся в диапазоне 4-15 ккал/моль. В слабых водородных связях расстояние донор-акцептор составляет 3,2-4,0 Å, а величины энергий находятся в 30 диапазоне <4 ккал/моль. Некоторыми примерами водородных связей с энергетическими уровнями являются F-H $\cdots$ F (38,6 ккал/моль), O-H $\cdots$ N (6,9 ккал/моль), O-H $\cdots$ O (5,0 ккал/моль), N-H $\cdots$ N (3,1 ккал/моль) и N-H $\cdots$ O (1,9 ккал/моль). См. больше в публикациях Perrin et al. "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology, Annual Review of Physical 35 Chemistry, vol. 48, pages 511-544, 1997; Guthrie, "Short strong hydrogen bonds: can they explain enzymic catalysis?" Chemistry & Biology March 1996, 3:163-170.

[252] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения применяемые согласно настоящему изобретению компоненты могут образовывать сильную водородную связь с мутантным полипептидом и/или его партнером по 40 связыванию. Данные компоненты имеют тенденцию содержать атом с сильной электроотрицательностью. Атомами, которые, как известно, обладают наибольшей электроотрицательностью, являются F>O>Cl>N в указанном порядке. Таким образом, в настоящем изобретении при образовании водородной связи, предпочтительно, применяют органическое соединение, которое содержит фтор, гидроксильную группу 45 или карбонильную группу. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для образования сильной водородной связи можно применять органический фтор.

[253] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используют

компоненты, способные к гидрофобному взаимодействию с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию. Такие компоненты включают органические соединения с гидрофобной группой.

[254] В настоящем документе термин «гидрофобное взаимодействие» относится к обратимым притягивающим взаимодействиям между гидрофобным соединением или гидрофобной областью соединения и другим гидрофобным соединением либо гидрофобной областью другого соединения. Данный тип взаимодействия описан в руководстве "Hydrophobic Interactions," A. Ben-Nairn (1980), Plenum Press, New York.

[255] От гидрофобных материалов молекулы воды отталкиваются вследствие их неполярной природы. Когда относительно неполярная молекула или группы в водном растворе ассоциируют с другими неполярными молекулами, а не с водой, данное явление называют «гидрофобным взаимодействием».

[256] Мутантные полипептиды и их партнеры по связыванию, как правило, включают аминокислоты, которые способны к гидрофобным взаимодействиям. Данные аминокислоты обычно характеризуются наличием по меньшей мере одной боковой цепи с неполярной группой, способной к гидрофобному взаимодействию. Гидрофобные аминокислоты включают, например, аланин (Ala), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), фенилаланин (Phe), валин (Val), пролин (Pro), глицин (Gly), в меньшей степени, метионин (Met) и триптофан (Trp).

[257] Компоненты, которые способны к гидрофобным взаимодействиям с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию, включают органические соединения, которые являются гидрофобными молекулами или молекулами, содержащими по меньшей мере один гидрофобный фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения данными гидрофобными компонентами могут являться углеводороды, выбранные из ароматических углеводородов, замещенных ароматических углеводородов, полиароматических углеводородов, ароматических или неароматических гетероциклов, циклоалканов, алканов, алкенов и алкинов. Гидрофобные группы могут включать ароматические группы, алкильные, циклоалкильные, алкенильные и алкинильные группы. В настоящем документе термины «алкил», «алкенил» и «алкинил» относятся к ненасыщенным алифатическим группам, содержащим от одного до тридцати атомов углерода, включая алкенильные/алкинильные группы с неразветвленной цепью, алкенильные/алкинильные группы с разветвленной цепью, циклоалкенильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкенильные/алкинильные группы. Такие углеводородные фрагменты также могут быть замещены по одному или нескольким атомам углерода.

[258] Понятно, что сила гидрофобного взаимодействия основана на доступном количестве «гидрофобных частиц», которые могут взаимодействовать друг с другом. Таким образом, гидрофобное взаимодействие можно регулировать, например, увеличением количества гидрофобного фрагмента в молекулах, участвующих в гидрофобном взаимодействии, и/или повышением его «гидрофобной» природы. Например, гидрофобный фрагмент, который в своей первоначальной форме может содержать углеводородную цепь, можно модифицировать для увеличения его гидрофобности (способности увеличивать силу гидрофобного взаимодействия участвующего фрагмента) посредством присоединения гидрофобной боковой цепи к одному из атомов углерода его углеродной основной цепи. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения это может включать присоединение различных полициклических соединений, включая, например, различные стероидные соединения и/или их производные, такие как соединения типа стерола, более конкретно,

холестерин. В целом, боковые цепи могут представлять собой линейные цепи, ароматические, алифатические, циклические, полициклические или любые другие типы гидрофобных боковых цепей, как это предусмотрено специалистами в данной области техники.

5 [259] Тип компонентов, которые способны к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию, обычно, но не всегда, представляет собой соединения с полярным фрагментом. В настоящем документе «ван-дер-ваальсовы взаимодействия» относятся к притяжению между атомами, фрагментами, молекулами и поверхностями, которые вызваны диполь-дипольными взаимодействиями
10 и/или корреляциями во флуктуирующих поляризациях соседних атомов, фрагментов или молекул вследствие квантовой динамики.

[260] Ван-дер-ваальсовы взаимодействия в настоящем изобретении представляют собой силы притяжения между мутантными полипептидами или партнерами по связыванию и компонентом. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия могут возникать из
15 трех источников. Во-первых, некоторые молекулы/фрагменты, хотя и являются электрически нейтральными, могут представлять собой постоянные электрические диполи. Вследствие фиксированного искажения в распределении заряда электронов в структуре некоторых молекул/фрагментов одна сторона молекулы/фрагмента всегда несколько положительна, а противоположная сторона несколько отрицательна.
20 Тенденция таких постоянных диполей к взаимному выравниванию приводит к возникновению чистой силы притяжения. Это - взаимодействие между двумя постоянными диполями (сила Кизома).

[261] Во-вторых, наличие молекул, которые являются постоянными диполями, может временно исказить заряд электрона в других соседних полярных или неполярных
25 молекулах, тем самым индуцируя дальнейшую поляризацию. Дополнительная сила притяжения возникает вследствие взаимодействия постоянного диполя с соседним индуцированным диполем. Данное взаимодействие между постоянным диполем и соответствующим индуцированным диполем можно назвать силой Дебая. В-третьих, хотя ни одна из участвующих молекул не является постоянным диполем (например,
30 органический жидкий бензол), между молекулами существует сила притяжения с двумя мгновенно индуцированными диполями в молекулах. Данное взаимодействие между двумя мгновенно индуцированными диполями можно назвать дисперсионной силой Лондона.

[262] Существует множество аминокислот в мутантном полипептиде и/или партнере
35 по связыванию, которые способны к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям. Данные аминокислоты могут содержать полярные боковые цепи, включая глутамин (Gln), аспарагин (Asn), гистидин (His), серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), цистеин (Cys), метионин (Met), триптофан (Trp). Данные аминокислоты могут также содержать боковую цепь с неполярной группой, включая аланин (Ala), изолейцин (Ile), лейцин (Leu),
40 фенилаланин (Phe), валин (Val), пролин (Pro), глицин (Gly).

[263] Компоненты, способные к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям с мутантным полипептидом и/или его партнером по связыванию, включают полярные или неполярные неорганические соединения, которые растворимы в растворе для анализа. Раствор для анализа, в целом, представляет собой водный раствор, и вследствие этого данные
45 полярные или неполярные неорганические соединения предпочтительным образом растворяются в воде. Предпочтительными материалами для ван-дер-ваальсовых взаимодействий являются те материалы, которые являются полярными, так что они способны к диполь-дипольным взаимодействиям. Например, AlF_3 содержит полярные

связи Al-F, и он растворим в воде (приблизительно 0,67 г/100 мл воды при 20°C). HgCl₂ содержит полярные связи Hg-Cl, и он растворим в воде в концентрации 7,4 г/100 мл при 20°C. PrCl₂ содержит полярные связи Pr-Cl, и он растворим в воде в концентрации приблизительно 1 г/100 мл при 20°C.

[264] Подходящие полярные соединения, которые способны к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, включают спирты, тиолы, кетоны, амины, амиды, сложные эфиры, простые эфиры и альдегиды. Подходящие примеры данных соединений были описаны выше в отношении водородной связи. Подходящие неполярные соединения, которые способны к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, включают ароматические углеводороды, замещенные ароматические углеводороды, полиароматические углеводороды, ароматические или неароматические гетероциклы, циклоалканы, алканы, алкены, алкины.

[265] Компоненты, способные к образованию водородных связей, гидрофобные компоненты и компоненты, способные к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, можно использовать для воздействия на связывание мутантного полипептида и его партнера по связыванию при помощи нескольких способов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения водородные связи, гидрофобные взаимодействия и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия могут вызвать образование мостика между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию. Такой мостик может привести указанный мутантный полипептид и партнера по связыванию в более тесную близость друг к другу, способствуя связыванию и/или расположению указанного мутантного полипептида и/или партнера по связыванию относительно друг друга таким образом, который облегчает связывание.

[266] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения образование водородных связей и/или гидрофобное взаимодействие может увеличивать вероятность связывания мутантного полипептида с его партнером по связыванию, например, посредством того, что полипептиды и партнеры по связыванию группируются или ассоциируют друг с другом способом, который увеличивает вероятность связывания. Таким образом, одно или несколько из данных взаимодействий можно применять по отдельности или в комбинации для того, чтобы сгруппировать мутантные полипептиды и партнеры по связыванию на более близком друг к другу расстоянии или для того, чтобы расположить мутантные полипептиды и партнеров по связыванию способом, который способствует связыванию, например, приводит к тому, что сайты связывания сближаются друг с другом, или к тому, что не способные к связыванию части молекул удаляются друг от друга, тем самым способствуя более близкому расположению сайтов связывания друг с другом.

[267] Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения водородные связи и/или гидрофобное взаимодействие могут воздействовать на конформацию мутантного полипептида и/или его партнера по связыванию с обеспечением конформации, которая больше способствует связыванию мутантного полипептида с его партнером по связыванию. Более конкретно, связывание или взаимодействие с одной или несколькими аминокислотами мутантного полипептида и/или партнера по связыванию может вызвать один или несколько конформационных сдвигов в мутантном полипептиде или партнере по связыванию, что способствует реакции связывания мутантного полипептида/партнера по связыванию.

[268] В настоящем изобретении проводят две пары анализов, один для поиска снижения активности мутантного полипептида при нормальном физиологическом условии по сравнению с родительским полипептидом, из которого был получен

мутантный полипептид, при указанном нормальном физиологическом условии, а второй анализ для поиска повышения активности мутантного полипептида в анализе при абберрантном условии по сравнению с родительским полипептидом, из которого был получен мутантный полипептид, при указанном абберрантном условии.

- 5 [269] Условие, применяемое в паре анализов согласно настоящему изобретению, можно выбрать из температуры, pH, осмотического давления, осмоляльности, окислительного стресса, концентрации электролита и концентрации любого другого компонента раствора или среды для анализа. Таким образом, конкретный компонент среды для анализа можно применять при по существу одинаковой концентрации в
10 обеих парах анализов. В данном случае компонент обычно присутствует с целью имитации конкретного окружения в организме человека или животного, такого как сыворотка, микроокружение опухоли, окружение сустава, окружение нейронов или любое другое окружение, которое можно обнаружить в точке введения, через которое может перемещаться вводимое лечение или которое можно обнаружить в точке лечения.
15 Одним из важных аспектов отбора одного или нескольких компонентов, имитирующих данные окружения, является то, что данный компонент может улучшать результаты процесса отбора, проведенного с применением пары анализов. Например, имитация конкретного окружения позволяет оценить различные эффекты воздействия конкретных компонентов данного окружения на мутантные полипептиды, подлежащие
20 эволюционированию в процессе отбора. Компоненты конкретного окружения могут, например, изменять или связываться с мутантным полипептидом, ингибировать активность мутантного полипептида, инактивировать мутантный полипептид и т.д.

- [270] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или несколько компонентов растворов для анализа предпочтительным образом
25 представляют собой малые соединения, такие как бисульфид, сульфид водорода, гистидин, гистамин, цитрат, бикарбонат, лактат и ацетат. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения низкомолекулярный компонент, предпочтительно, присутствует в растворе для анализа в концентрации от приблизительно 100 мкМ до приблизительно 100 мМ, или, более предпочтительно, от приблизительно 0,5 до
30 приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 1 до приблизительно 10 мМ.

- [271] Концентрация компонента в растворах для анализа может быть одинаковой или по существу одинаковой с концентрацией того же компонента, которая обычно присутствует во природной физиологической жидкости млекопитающего, такого как человек. Данную концентрацию можно назвать нормальной физиологической
35 концентрацией компонента в физиологической жидкости. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения концентрация конкретного компонента в растворах для анализа может быть меньшей или большей, чем концентрация того же компонента, которая обычно присутствует во природной физиологической жидкости млекопитающего, такого как человек.

- 40 [272] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в каждой из пар анализов компонент может присутствовать в по существу различных концентрациях. В данном случае присутствие, отсутствие или концентрация компонента становится условием, которое исследуют, поскольку именно концентрация компонента является условием, которое отличает растворы для анализа для проведения анализа при
45 нормальном физиологическом условии и раствор для анализа для проведения анализа при абберрантном условии. Таким образом, условно активный полипептид, полученный при помощи данного варианта реализации способа согласно настоящему изобретению, будет отобран для активности, по меньшей мере частично зависящей от концентрации

указанного компонента.

[273] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент может присутствовать в одной паре растворов для анализа, но полностью отсутствует в другой паре растворов для анализа. Например, концентрацию лактата в растворе для анализа для аберрантного условия можно установить на уровне, имитирующем концентрацию лактата в микроокружении опухоли. Лактат может отсутствовать в паре растворов для анализа для нормального физиологического условия.

[274] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нормальное физиологическое условие представляет собой первую концентрацию лактата, представляющую нормальное физиологическое условие, а аберрантное условие представляет собой вторую концентрацию лактата, представляющую аберрантное условие, которое существует в определенном месторасположении в организме.

[275] В другом примере глюкоза может отсутствовать в растворе для анализа для аберрантного условия для имитации отсутствия глюкозы, которое можно обнаружить в микроокружении опухоли, тогда как в паре растворов для анализа для проведения анализа для нормального физиологического условия концентрацию глюкозы можно установить на уровне, который имитирует концентрацию глюкозы в плазме крови. Данное свойство можно применять для предпочтительной доставки условно активного полипептида в месторасположение или окружение без какой-либо активности или с минимальной активностью в процессе транспортировки и активации условно активного полипептида при его поступлении в окружение, где указанный компонент присутствует в концентрации в растворе для анализа для аберрантного условия.

[276] Например, микроокружение опухоли обычно содержит как более низкую концентрацию глюкозы, так и более высокую концентрацию лактата по сравнению с сывороткой человека. Нормальная физиологическая концентрация глюкозы в сыворотке находится в диапазоне от приблизительно 2,5 мМ до приблизительно 10 мМ. С другой стороны, в микроокружении опухоли концентрация глюкозы обычно очень мала и находится в диапазоне от 0,05 мМ до 0,5 мМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в растворе для анализа для проведения анализа при нормальном физиологическом условии концентрация глюкозы находится в диапазоне от приблизительно 2,5 мМ до приблизительно 10 мМ, а в растворе для анализа для проведения анализа при аберрантном условии концентрация глюкозы находится в диапазоне от приблизительно 0,05 мМ до приблизительно 0,5 мМ. Полученный таким образом условно активный полипептид обладает более высокой активностью в окружении с низким содержанием глюкозы (в микроокружении опухоли), чем в окружении с более высоким содержанием глюкозы (в нормальных тканях или крови). Данный условно активный полипептид будет функционировать в микроокружении опухоли, однако будет обладать низкой активностью в процессе транспортирования в кровотоке.

[277] Нормальная физиологическая концентрация лактата в сыворотке находится в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 2 мМ. С другой стороны, концентрация лактата в микроокружении опухоли, как правило, находится в диапазоне от 10 мМ до 20 мМ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в растворе для анализа для проведения анализа при нормальном физиологическом условии концентрация лактата находится в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 2 мМ, а в растворе для анализа для проведения анализа при аберрантном условии концентрация лактата находится в диапазоне приблизительно 10 мМ до приблизительно 20 мМ. Полученный таким образом условно активный

полипептид обладает более высокой активностью в окружении с высокой концентрацией лактата (в микроокружение опухоли), чем в окружении с более низкой концентрацией лактата (в нормальных тканях или крови). Данный условно активный полипептид будет, таким образом, функциональным в микроокружении опухоли, однако будет

5 обладать низкой активностью в процессе транспортирования в кровотоке.

[278] Аналогичным образом, известно, что болящие мышцы содержат более высокую (аберрантную) концентрацию лактата, чем нормальные. Таким образом, при поиске мутантного полипептида, который будет активен в окружении болящих мышц, можно провести пару анализов при аберрантном условии в присутствии более высокой

10 концентрации лактата для имитации окружения болящих мышц, тогда как пару анализов при нормальном физиологическом условии можно провести при более низкой концентрации лактата или при отсутствии лактата. Таким образом, мутантный полипептид можно отобрать в отношении усиленной активности в окружении болящих мышц с повышенной концентрацией лактата. Такой условно активный полипептид

15 может быть подходящим, например, в качестве противовоспалительного средства.

[279] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения два или более компонентов могут использоваться в обеих парах растворов для анализа. В данном типе анализа условно активный полипептид можно отобрать с применением характеристик обоих двух типов анализов, описанных выше. В качестве альтернативы,

20 селективность условно активного полипептида можно увеличить с применением двух или более компонентов. Например, возвращаясь к микроокружению опухоли, пару анализов при аберрантном условии можно провести в среде для анализа как с высокой концентрацией лактата, так и с низкой концентрацией глюкозы, тогда как соответствующую пару анализов при нормальном физиологическом условии можно

25 провести в среде для анализа как с относительно более низкой концентрацией лактата, так и с относительно более высокой концентрацией глюкозы.

[280] Настоящее изобретение предусматривает, что каждый компонент, отобранный из неорганических соединений, ионов и органических молекул, можно применять по отдельности или в комбинации для отбора условно активного полипептида, который

30 является более активным при одной концентрации компонента, чем при другой концентрации того же компонента.

[281] Анализы, основанные на различных концентрациях одного или нескольких метаболитов в качестве дифференцирующего условия или условий между нормальным окружением (нормальное физиологическое условие) и аберрантным окружением

35 (аберрантное условие), могут быть в особенности подходящими для отбора условно активного полипептида, который является более активным в микроокружении опухоли, чем в плазме крови, поскольку микроокружение опухоли обычно содержит значительное количество метаболитов, концентрация которых отличается от концентраций тех же метаболитов в плазме крови.

[282] В публикации Kinoshita et al., "Absolute Concentrations of Metabolites in Human Brain Tumors Using In Vitro Proton Magnetic Resonance Spectroscopy," NMR IN BIOMEDICINE, vol. 10, pp.2-12, 1997 проводили сравнение содержания метаболитов

40 здорового головного мозга и в опухолях головного мозга. Данная группа обнаружила, что концентрация N-ацетиласпартата в здоровом головном мозге составляет 5000-6000 мкМ, однако его концентрация в глиобластоме составляет всего лишь 300-400 мкМ, в астроцитоме - 1500-2000 мкМ и в анапластической астроцитоме - 600-1500 мкМ. Кроме того, концентрация инозитола в здоровом головном мозге составляет 1500-2000 мкМ, однако его концентрация в глиобластоме составляет 2500-4000 мкМ, в астроцитоме -

2700-4500 мкМ и в анапластической астроцитоме - 3800-5800 мкМ. Концентрация фосфорилэтаноламина в здоровом головном мозге составляет 900-1200 мкМ, однако его концентрация в глиобластоме составляет 2000-2800 мкМ, в астроцитоме - 1170-1370 мкМ и в анапластической астроцитоме 1500-2500 мкМ. Концентрация глицина в здоровом головном мозге составляет 600-1100 мкМ, однако его концентрация в глиобластоме составляет 4500-5500 мкМ, в астроцитоме - 750-1100 мкМ и в анапластической астроцитоме 1900-3500 мкМ. Концентрация аланина в здоровом головном мозге составляет 700-1150 мкМ, однако его концентрация в глиобластоме составляет 2900-3600 мкМ, в астроцитоме - 800-1200 мкМ и в анапластической астроцитоме - 300-700 мкМ. Концентрация данных метаболитов в крови может также быть различной, например, концентрация N-ацетиласпартата в крови составляет приблизительно 85000 мкМ; концентрация инозитола в крови составляет приблизительно 21700 мкМ; концентрация глицина составляет приблизительно 220-400 мМ; концентрация аланина в крови составляет приблизительно 220-300 мкМ.

[283] Следовательно, данные метаболиты, включая по меньшей мере N-ацетиласпартат, инозитол, глицин и аланин, можно применять при различных концентрациях в растворах для анализа для осуществления отбора условно активных полипептидов, которые активны в опухолях головного мозга, однако не активны в крови или здоровой ткани головного мозга. Например, раствор для анализа с концентрацией N-ацетиласпартата 85000 мкМ можно применять в паре анализов при нормальном физиологическом условии, а раствор для анализа с концентрацией N-ацетиласпартата 350 мкМ можно применять в паре анализов при абберрантном условии для осуществления отбора условно активных полипептидов, которые являются активными в микроокружении опухоли глиобластомы, однако являются не активными или по меньшей мере менее активными в крови или здоровой ткани головного мозга.

[284] В публикации Mayers et al., "Elevated circulating branched chain amino acids are an early event in pancreatic adenocarcinoma development," Nature Medicine, vol. 20, pp.1193-1198, 2014 изучали концентрации ряда различных метаболитов, включая аминокислоты с разветвленной боковой цепью, в преддиагностической плазме крови пациентов с заболеваниями поджелудочной железы. Было обнаружено, что у пациентов с опухолями поджелудочной железы обнаруживается несколько метаболитов, которые присутствуют в кровотоке в отличных концентрациях по сравнению с концентрациями тех же метаболитов в крови человека без рака поджелудочной железы. Mayers и др. также обнаружили, что у пациентов с раком поджелудочной железы содержание аминокислот с разветвленной боковой цепью в плазме крови в значительной степени повышено по сравнению с нормальными субъектами. Аминокислоты с разветвленной боковой цепью, присутствующие в повышенных концентрациях, включают изолейцин, лейцин и валин (таблица 1 публикации Mayers и др.). Существуют другие метаболиты, представленные на фигуре 1 публикации Mayers и др., которые присутствуют в значительной степени различных концентрациях в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы и нормальных здоровых людей. Данные метаболиты включают по меньшей мере ацетилглицин, глицин, фенилаланин, тирозин, 2-аминоадипат, тауродезоксикхолат/ таурохенодесоксикхолат, аконитат, изоцитрат, лактат, α -глицерофосфат и урат. Таким образом, основываясь на выводах о том, что определенные метаболиты присутствуют в различных концентрациях в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы и нормальных здоровых пациентов, можно предположить, что микроокружение опухоли рака поджелудочной железы будет также содержать отличные концентрации данных метаболитов, чем концентрации, в которых они присутствовали бы в микроокружении

поджелудочной железы здорового пациента.

[285] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или несколько данных метаболитов можно применять в растворе для анализа для нормального физиологического условия в количествах, которые приблизительно соответствуют концентрациям данных метаболитов в плазме крови у здорового индивидуума (т.е. нормальным физиологическим концентрациям метаболитов). Например, известные нормальные физиологические концентрации в плазме крови здорового человека для изолейцина составляют приблизительно $1,60 \pm 0,31$ мг/дл, для лейцина - приблизительно $1,91 \pm 0,34$ мг/дл и для валина - приблизительно $2,83 \pm 0,34$ мг/дл. Раствор для анализа для нормального физиологического условия может содержать нормальные физиологические концентрации одной или нескольких данных аминокислот с разветвленной боковой цепью в данных диапазонах. Раствор для анализа для аберрантного условия может содержать те же аминокислоты с разветвленной боковой цепью в концентрациях, которые приблизительно в 5 раз, или приблизительно в 10 раз, или приблизительно в 20 раз, или приблизительно в 50 раз, или приблизительно в 70 раз, или приблизительно в 100 раз, или приблизительно 150, или приблизительно в 200 раз, или приблизительно в 500 раз превышают нормальные физиологические концентрации соответствующих аминокислот с разветвленной боковой цепью у здорового индивидуума. Это будет отражать тот факт, что на основании результатов публикации Mayers и др. ожидается, что микроокружение опухоли поджелудочной железы будет содержать в значительной степени повышенные концентрации данных аминокислот с разветвленной боковой цепью, поскольку более высокие концентрации данных аминокислот с разветвленной боковой цепью, обнаруживаемые в плазме крови, которые определили Mayers и др., происходят из микроокружения опухоли и растворяются в кровотоке. Аналогичным образом, анализ при аберрантном условии может отражать концентрации других метаболитов в крови пациента с раком поджелудочной железы, даже если концентрации конкретных метаболитов в значительной степени ниже у пациента с раком, чем у нормального индивидуума. Таким образом, скрининг может имитировать фактическую среду и тем самым обеспечивать, чтобы были отобраны мутанты с наивысшей активностью для данного конкретного окружения.

[286] Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения раствор для анализа для нормального физиологического условия может содержать одну или несколько аминокислот с разветвленной боковой цепью в концентрациях, имитирующих концентрации в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы, для имитации фактического окружения плазмы крови для данных пациентов. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения раствор для анализа для аберрантного условия может содержать те же аминокислоты с разветвленной боковой цепью в концентрациях, которые приблизительно в 2 раза, или приблизительно в 3 раза, или приблизительно в 4 раза, или приблизительно в 5 раз, или приблизительно в 7 раз, или приблизительно в 8 раз, или приблизительно в 10 раз, или приблизительно в 15 раз, или приблизительно в 20 раз, или приблизительно в 50 раз превышают концентрации соответствующих аминокислот с разветвленной боковой цепью в плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы, чтобы отразить тот факт, что данные более высокие концентрации происходят из микроокружения опухоли, а концентрации в кровотоке представляют собой разбавление фактических концентраций микроокружения опухоли. Аналогичным образом, концентрация других метаболитов в растворе для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия также

может быть различной, чтобы продемонстрировать ожидаемые фактические различия в данных, собранных для кровотока. В некоторых случаях в кровотоке пациента с панкреатитом можно отметить недостаток определенного метаболита, и в данном случае концентрацию, отображающую измеряемую в кровотоке концентрацию, можно
 5 применять в анализе для нормального физиологического условия, и еще более низкую концентрацию можно применять в анализе для аберрантного состояния, ожидая, что указанный метаболит, вероятно, будет поглощен микроокружением опухоли. Условно активные полипептиды, отобранные таким образом с применением растворов для анализа, будут более активны в микроокружении рака поджелудочной железы, чем в
 10 плазме крови пациентов с раком поджелудочной железы.

[287] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно применять всю плазму крови пациентов с раком поджелудочной железы. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения имитацию одного или нескольких компонентов плазмы крови пациента с раком поджелудочной железы
 15 можно применять в растворах для анализа для проведения одного или обоих анализов при нормальном физиологическом условии и аберрантном условии. Согласно иллюстративному варианту реализации настоящего изобретения рН раствора для анализа для нормального физиологического условия находится в диапазоне 7,2-7,6 с добавлением 30 масс. % плазмы крови пациента с раком поджелудочной железы, а рН
 20 раствора для анализа для аберрантного условия находится в диапазоне 6,2-6,8 с добавлением 30 масс. % плазмы крови пациента с раком поджелудочной железы. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения плазма крови пациента с раком поджелудочной железы присутствует как для гарантии того, чтобы (1) в крови не происходила активация условно активного полипептида при рН 7,2-7,6, и (2) также
 25 для гарантии того, чтобы условно активный полипептид мог быть активированным при рН 5,5-7,2, 6-7, или 6,2-6,8 в микроокружении опухоли даже в присутствии данной композиции метаболитов, которые обнаруживаются в крови пациента с раком поджелудочной железы. Это позволит адаптировать лечение под пациента с раком поджелудочной железы.

[288] Согласно другому иллюстративному варианту реализации настоящего изобретения рН раствора для анализа для нормального физиологического условия находится в диапазоне 7,2-7,6 с добавлением 30 масс. % плазмы крови пациента с раком поджелудочной железы, а рН раствора для анализа для аберрантного условия находится в диапазоне 5,5-7,2 или 6,2-6,8, и в раствор не добавляют какую-либо плазму крови
 30 пациента с раком поджелудочной железы.

[289] Тот же компонент, выбранный из неорганических соединений, ионов и органических молекул, можно применять в каждом из нескольких типов анализов, которые обсуждаются выше. Например, в случае лактата лактат можно применять по существу в той же концентрации в паре растворов для анализа как при нормальном
 40 физиологическом условии, так и при аберрантном условии. Далее нормальное физиологическое условие и аберрантное условие будут отличаться одним или несколькими другими аспектами, такими как температура, рН, концентрация другого компонента и т.д. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения лактат можно применять в качестве одного из дифференцировочных факторов между
 45 нормальным физиологическим условием и аберрантным условием, чтобы отразить тот факт, что лактат характеризуется более высокой концентрацией в аберрантном микроокружении опухоли, чем при нормальном физиологическом условии (неопухоловое микроокружение).

[290] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два или более компонентов добавляют по существу при одной и той же концентрации в оба раствора для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия. Например, к растворам для анализа добавляют как цитрат, так и бычий сывороточный альбумин (БСА). Концентрация цитрата в обоих растворах для анализа может составлять приблизительно 80 мкМ, а концентрация БСА может составлять приблизительно 10-20%. Более конкретно, раствор для анализа для проведения пары анализов при нормальном физиологическом условии может характеризоваться рН в диапазоне 7,2-7,6 при концентрации цитрата приблизительно 80 мкМ и концентрации БСА приблизительно 10-20%. Раствор для анализа для проведения пары анализов при аберрантном условии может характеризоваться рН в диапазоне 6,2-6,8 при концентрации цитрата приблизительно 80 мкМ и концентрации БСА приблизительно 10-20%.

[291] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения к обоим растворам для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия можно добавить сыворотку по существу в одинаковой концентрации. Поскольку сыворотка содержит большое количество неорганических соединений, ионов, органических молекул (включая полипептиды), растворы для анализа будут содержать множество и большое количество компонентов, выбранных из неорганических соединений, ионов, органических молекул, представленных по существу в одинаковых концентрациях в двух растворах для анализа. Растворы для анализа могут содержать от 5 до 30 об. %, или от 7 до 25 об. %, или от 10 до 20 об. %, или от 10 до 15 об. % сыворотки. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения растворы для анализа как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии не содержат сыворотки. Сыворотка может представлять собой сыворотку человека, бычью сыворотку или сыворотку любых других млекопитающих. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения растворы для анализа не содержат сыворотки.

[292] Растворы для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия могут характеризоваться различными рН. рН таких растворов для анализа можно откорректировать с применением уровней CO_2 и O_2 в буфере посредством использования бикарбоната.

[293] Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения к растворам для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия добавляют один из двух или более компонентов в различных концентрациях. Например, к растворам для анализа добавляют как лактат, так и бычий сывороточный альбумин (БСА). Концентрация лактата может различаться в растворах для анализа для нормального физиологического условия и аберрантного условия, тогда как концентрация БСА может быть одинаковой в обоих растворах для анализа. Концентрация лактата может находиться в диапазоне от 30 до 50 мг/дл в растворе для анализа для аберрантного условия и в диапазоне от 8 до 15 мг/дл в растворе для анализа для нормального физиологического условия. С другой стороны, концентрация БСА будет одинаковой в обоих растворах для анализа, такой как, например, приблизительно 10-20%. Условно активный полипептид, отобранный с применением данных растворов для анализа, является более активным при высокой концентрации лактата 30-50 мг/дл, чем при низкой концентрации лактата 8-15 мг/дл, в присутствии БСА.

[294] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растворы для анализа можно разработать для отбора условно активных полипептидов с активностью, зависящей от двух или более условий. Согласно одному иллюстративному

варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид может обладать активностью, зависящей как от pH, так и от содержания лактата. Растворы для анализа для проведения отбора такого условно активного полипептида могут представлять собой раствор для анализа для нормального физиологического условия с pH 7,2-7,6, концентрацией лактата в диапазоне от 8 до 15 мг/дл. Раствор для анализа для аберрантного условия может характеризоваться pH 6,2-6,8, концентрацией лактата в диапазоне от 30 до 50 мг/дл. Необязательно, растворы для анализа как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии могут также содержать ион для содействия связыванию между мутантным полипептидом и его партнером по связыванию, таким образом, чтобы увеличить количество попаданий для биологически активного полипептида-кандидата.

[295] Согласно еще одному иллюстративному варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид может обладать активностью, зависящей от pH, содержания глюкозы и лактата. Растворы для анализа для осуществления отбора такого условно активного полипептида могут представлять собой растворы для анализа для нормального физиологического условия с pH 7,2-7,6, концентрацией глюкозы в диапазоне 2,5-10 mM, концентрацией лактата в диапазоне от 8 до 15 мг/дл. Раствор для анализа для аберрантного условия может характеризоваться pH 6,2-6,8, концентрацией глюкозы в диапазоне от 0,05 до 0,5 mM, концентрацией лактата в диапазоне от 30 до 50 мг/дл. Необязательно, растворы для анализа как при нормальном физиологическом условии, так и при аберрантном условии могут также содержать ион, способствующий связыванию между мутантными полипептидами и их партнером по связыванию, таким образом, чтобы увеличить количество связываний биологически активного полипептида-кандидата с партнером по связыванию при pH 6,2-6,8. Отобранный с применением таких аналитических растворов условно активный полипептид является более активным в окружении с pH 6,2-6,8, концентрацией глюкозы от 0,05 до 0,5 mM и концентрацией лактата от 30 до 50 мг/дл, чем в окружении с pH 7,2-7,6, концентрацией глюкозы от 2,5 до 10 mM и концентрацией лактата от 8 до 15 мг/дл.

[296] Два или более компонентов, выбранных из неорганических соединений, ионов и органических молекул, предназначены для получения раствора для анализа для аберрантного условия, который имитирует окружение в том месторасположении/участке, куда будет осуществлена доставка отобранного условно активного полипептида (т.е. в целевом участке). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере три компонента, присутствующих в окружении целевого участка, можно добавить к раствору для анализа, или по меньшей мере четыре компонента, присутствующих в окружении целевого участка, можно добавить к раствору для анализа, или по меньшей мере пять компонентов, присутствующих в окружении целевого участка, можно добавить к раствору для анализа, или по меньшей мере шесть компонентов, присутствующих в окружении целевого участка, можно добавить к раствору для анализа.

[297] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения жидкость, извлеченную из целевого участка (в котором условно активный полипептид будет более активным), можно непосредственным образом применять в качестве раствора для анализа при аберрантном условии. Например, синовиальную жидкость можно извлечь из субъекта, предпочтительно, из субъекта с заболеванием суставом, нуждающегося в лечении. Извлеченную синовиальную жидкость, необязательно разбавленную, можно применять в качестве раствора для анализа в паре исследований при аберрантном условии для того, чтобы осуществить отбор условно активного полипептида. С

применением извлеченной синовиальной жидкости, необязательно разбавленной, в качестве раствора для анализа для проведения анализа при аберрантном условии и раствора для анализа, который имитирует плазму крови человека, для проведения анализа при нормальном физиологическом условии, условно активный полипептид (например, ФНО-альфа), который отбирают, будет более активен в суставе, чем в других месторасположениях или органах. Например, субъекты с воспаленными суставами (такими как артрит) могут получать лечение ФНО-альфа. Однако при применении ФНО-альфа, как правило, наблюдают серьезные побочные эффекты от повреждения других тканей и органов. Условно активный ФНО-альфа, который является более активным в синовиальной жидкости, однако не является активным или является менее активным в крови, будет осуществлять доставку активности ФНО-альфа в суставы при одновременном снижении или потенциальном устранении побочных эффектов ФНО-альфа на остальные участки тела.

[298] Разработка условно активного полипептида, который обладает активностью, зависящей от множества условий, приведет к улучшенной селективности условно активного полипептида в отношении целевого участка в теле субъекта. В идеальном случае в других месторасположениях, где присутствуют только некоторые из условий, условно активный полипептид не является активным или по меньшей мере является в значительной степени менее активным. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид, который является активным при рН 6,2-6,8, концентрации глюкозы от 0,05 до 0,5 мМ и концентрации лактата от 30 до 50 мг/дл, можно специфичным образом доставить в микроокружение опухоли, поскольку все данные условия присутствуют в микроокружении опухоли. Другие ткани или органы могут характеризоваться одним или двумя из данных присутствующих условий, но не всеми тремя, в связи с чем этого недостаточно для того, чтобы полностью активировать условно активный полипептид в других тканях или органах. Например, мышца, подвергаемая физической нагрузке, может характеризоваться низким рН в диапазоне 6,2-6,8. Однако она может не содержать другого исследуемого условия. Таким образом, условно активный полипептид является не активным или по меньшей мере менее активным в мышце, подвергаемой физической нагрузке.

[299] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно предпринять шаги для подтверждения того, что активность условно активного полипептида действительно зависит от условий, применяемых для осуществления отбора условно активного полипептида. Например, условно активный полипептид отбирают таким образом, чтобы он зависел от трех условий: рН 6,2-6,8, концентрации глюкозы от 0,05 до 0,5 мМ и концентрации лактата от 30 до 50 мг/дл. Отобранный условно активный полипептид можно затем исследовать при каждом из трех условий индивидуальным образом и в окружениях с парами из трех условий для того, чтобы подтвердить, что условно активный полипептид является не активным или менее активным в данных исследуемых условиях или окружениях.

[300] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения содержание определенных компонентов сыворотки можно намеренно свести к минимуму или исключить данные компоненты из среды для анализа. Например, при проведении скрининга антител содержание компонентов сыворотки, которые связывают или адсорбируют антитела, можно свести к минимуму или исключить данные компоненты из среды для анализа. Такие связанные антитела могут вызывать псевдоположительные результаты, которые, как следствие, содержат связанные мутантные антитела, которые не являются условно активными, а вместо этого связаны с компонентом,

присутствующим в сыворотке, при ряде различных условий. Таким образом, тщательный отбор компонентов для проведения анализа для минимизации или исключения компонентов, которые могут потенциальным образом связываться с мутантами при проведении анализа, можно применять для уменьшения числа нефункциональных мутантов, которых можно непреднамеренно идентифицировать как положительные для условной активности вследствие связывания с компонентом в анализе, отличным от желаемого партнера по связыванию. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых проводят скрининг мутантных полипептидов со склонностью к связыванию с компонентами в сыворотке человека, в растворе для анализа можно применять БСА для уменьшения или устранения возможности получения псевдоположительных результатов, вызванных связыванием мутантных полипептидов с компонентами сыворотки человека. Другие аналогичные замены также можно осуществить в конкретных случаях для достижения той же цели.

[301] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условия анализа имитируют окружение вблизи от мембраны клетки, например, внутри, на или за пределами мембраны клетки, или окружение в суставе. Некоторые факторы, которые могут влиять на активность связывания при проведении скрининга в окружении мембраны клетки, включают экспрессию рецепторов, интернализацию, активность комплекса антитело-лекарственное средство (antibody drug complex, ADC) и т.д.

[302] Формат анализов может представлять собой любые подходящие анализы, известные специалисту в данной области техники. Примеры включают ELISA, анализ ферментативной активности, скрининг реальных тканей *in vitro* (органов и т.д.), микроскопические препараты тканей, целых животных, линии клеток и применение 3D-систем. Например, подходящие анализы на основе клеток описаны в публикации WO 2013/040445, анализы на основе тканей описаны в патенте США №7993271, способы проведения скрининга на основе целых животных описаны в патенте США №2010/0263599, способы скрининга на основе 3D-систем описаны в патенте США №2011/0143960.

[303] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения на этапе эволюционирования можно получить мутантные полипептиды, которые могут одновременно обладать другими желаемыми свойствами, помимо условно активных характеристик, обсуждаемых выше. Подходящие другие желаемые свойства, которые можно эволюционировать, могут включать активность связывания, экспрессию, гуманизацию и т.д. Вследствие этого, настоящее изобретение можно использовать для получения условно активного полипептида, который также содержит улучшение по меньшей мере одного или нескольких из данных других желаемых свойств.

[304] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении получают условно активный полипептид. Можно дополнительно мутировать отобранный условно активный полипептид с применением одной из методик мутагенеза, раскрытых в настоящем документе, например, на втором этапе эволюционирования, для улучшения другого свойства отобранного условно активного полипептида, такого как активность связывания, экспрессия, гуманизация и т.д. После второго этапа эволюционирования можно провести скрининг мутантных полипептидов в отношении условной активности и улучшенного свойства.

[305] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения после эволюционирования родительского полипептида для получения мутантных полипептидов отбирают первый условно активный полипептид, который демонстрирует как: (а) снижение первой активности в анализе при нормальном физиологическом

условии по сравнению с родительским полипептидом, так и (b) повышение первой активности в анализе при аберрантном условии по сравнению с родительским полипептидом. Первый условно активный полипептид можно затем дополнительно подвергнуть одному или нескольким дополнительным этапам эволюционирования, экспрессии и отбора для того, чтобы выбрать по меньшей мере второй условно активный полипептид, который (1) демонстрирует как: (a) снижение второй активности в анализе при нормальном физиологическом условии по сравнению с родительским полипептидом, так и (b) повышение второй активности в анализе при аберрантном условии по сравнению с родительским полипептидом, или (2) большее соотношение между первой активностью при аберрантном условии и второй активностью при нормальном физиологическом условии по сравнению с первым условно активным полипептидом и/или родительским полипептидом. Отметим, что второй условно активный полипептид может обладать как первой активностью, так и второй активностью, более высокой при аберрантном условии по сравнению с родительским полипептидом, а также первой активностью и второй активностью, более низкой при нормальном физиологическом условии по сравнению с родительским полипептидом.

[306] Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение направлено на получение условно активных полипептидов с более высоким отношением активности при аберрантном условии (или втором условии) и активности при нормальном физиологическом условии (или первом условии) (например, более высокая селективность между аберрантными и нормальными физиологическими условиями). Соотношение, или селективность, активности при аберрантном условии (или втором условии) и активности при нормальном физиологическом условии (или первом условии) может составлять по меньшей мере приблизительно 2:1, или по меньшей мере приблизительно 3:1, или по меньшей мере приблизительно 4:1, или по меньшей мере приблизительно 5:1, или по меньшей мере приблизительно 6:1, или по меньшей мере приблизительно 7:1, или по меньшей мере приблизительно 8:1, или по меньшей мере приблизительно 9:1, или по меньшей мере приблизительно 10:1, или по меньшей мере приблизительно 11:1, или по меньшей мере приблизительно 12:1, или по меньшей мере приблизительно 13:1, или по меньшей мере приблизительно 14:1, или по меньшей мере приблизительно 15:1, или по меньшей мере приблизительно 16:1, или по меньшей мере приблизительно 17:1, или по меньшей мере приблизительно 18:1, или по меньшей мере приблизительно 19:1, или по меньшей мере приблизительно 20:1, или по меньшей мере приблизительно 30:1, или по меньшей мере приблизительно 40:1, или по меньшей мере приблизительно 50:1, или по меньшей мере приблизительно 60:1, или по меньшей мере приблизительно 70:1, или по меньшей мере приблизительно 80:1, или по меньшей мере приблизительно 90:1, или по меньшей мере приблизительно 100:1.

[307] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид представляет собой антитело, которое может характеризоваться отношением между активностью при аберрантном условии и активностью при нормальном физиологическом условии по меньшей мере приблизительно 5:1, или по меньшей мере приблизительно 6:1, или по меньшей мере приблизительно 7:1, или по меньшей мере приблизительно 8:1, или по меньшей мере приблизительно 9:1, или по меньшей мере приблизительно 10:1, или по меньшей мере приблизительно 15:1, или по меньшей мере приблизительно 20:1, или по меньшей мере приблизительно 40:1, или по меньшей мере приблизительно 80:1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид применяют для нацеливания на участок опухоли, в котором условно активный полипептид является активным в участке опухоли

(в микроокружении опухоли) и в значительной степени является менее активным или неактивным в неопухолевом участке (нормальное физиологическое условие).

[308] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения условно активный полипептид представляет собой антитело, которое предназначено для конъюгации с другим средством, таким как таковые, которые описаны в других частях настоящего документа. Условно активное антитело может характеризоваться более высоким значением отношения активности при аберрантном условии к активности при нормальном физиологическом условии. Например, условно активное антитело, которое следует конъюгировать с другим средством, может характеризоваться отношением активности при аберрантном условии к активности при нормальном физиологическом условии по меньшей мере приблизительно 10:1, или по меньшей мере приблизительно 11:1, или по меньшей мере приблизительно 12:1, или по меньшей мере приблизительно 13:1, или по меньшей мере приблизительно 14:1, или по меньшей мере приблизительно 15:1, или по меньшей мере приблизительно 16:1, или по меньшей мере приблизительно 17:1, или по меньшей мере приблизительно 18:1, или по меньшей мере приблизительно 19:1, или по меньшей мере приблизительно 20:1. Это может быть особенно важно, когда конъюгированное средство является, например, токсичным или радиоактивным, поскольку такое конъюгированное средство желательно концентрировать на пораженном заболеванием участке или на участке, лечение которого проводят (в котором присутствует аберрантное условие).

Г. Получение условно активных полипептидов

[309] Отобранные условно активные полипептиды с обратимой или необратимой активностью можно получить для терапевтических, диагностических, исследовательских и связанных целей и/или можно подвергнуть одному или нескольким дополнительным циклам эволюционирования и отбора.

[310] Условно активные полипептиды можно получить с применением экспрессирующей полипептид клетки хозяина- или организма-продуцента. Чтобы сделать процесс получения более эффективным, ДНК, кодирующую условно активный полипептид, можно подвергнуть оптимизации кодонов для клетки хозяина- или организма-продуцента. Оптимизация кодонов была описана ранее, например, в публикации Narum et al., "Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice," Infect. Immun. 2001 December, 69(12):7250-3, в которой описана оптимизация кодонов в системе мыши; в публикации Outchkourov et al., "Optimization of the expression of Equistatin in Pichia pastoris, protein expression and purification," Protein Expr. Purif. 2002 February; 24(1):18-24, в которой описана оптимизация кодонов в системе дрожжей; в публикации Feng et al., "High level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain" Biochemistry 2000 Dec. 19, 39(50):15399-409, в которой описана оптимизация кодонов у E. coli; в публикации Humphreys et al., "High-level periplasmic expression in Escherichia coli using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence", Protein Expr. Purif 2000 Nov. 20(2):252-64, в которой описано, как применение кодонов влияет на секрецию белка у E. coli.

[311] Клетка хозяина-продуцента может представлять собой систему млекопитающего, которая выбрана из одной из групп, состоящих из линий клеток CHO, HEK293, IM9, DS-I, THP-I, Hep G2, COS, NIH 3T3, C33a, A549, A375, SK-MEL-28, DU 145, PC-3, HCT 116, Mia PACA-2, ACHN, Юркат, MMI, Ovar 3, HT 1080, Panc-1, U266, 769P, BT-474, Caco-2, HCC 1954, MDA-MB-468, LnCAP, NRK-49F и SP2/0; и спленоцитов мыши и

МКПК кролика. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения система млекопитающего выбрана из линии клеток СНО или НЕК293. Согласно одному конкретному аспекту система млекопитающего представляет собой линию клеток СНО-S. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения система

млекопитающего представляет собой линию клеток НЕК293.

[312] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка хозяина-производителя представляет собой систему клеток дрожжей, например, клетки дрожжей *S. cerevisiae* или клетки дрожжей *Pichia*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка хозяина-производителя представляет собой прокариотические клетки, такие как *E. coli* (Owens RJ and Young RJ, *J. Immunol. Meth.*, vol. 168, p. 149, 1994; Johnson S and Bird RE, *Methods Enzymol*, vol. 203, p. 88, 1991). Условно активный полипептид можно также получить в растениях (Firek et al. *Plant Mol. Biol.*, vol. 23, p. 861, 1993).

[313] Условно активные полипептиды можно также получить посредством синтетических способов с применением химических способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, публикации Caruthers, "New chemical methods for synthesizing polynucleotides," *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn, "Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: design and synthetic strategy to the synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP)," *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980; Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa, 1995. Например, пептидный синтез можно осуществить с применением различных твердофазных методик (см., например, публикации Roberge, "A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support", *Science* 269:202, 1995; Merrifield, "Concept and early development of solid-phase peptide synthesis", *Methods Enzymol.* 289:3-13, 1997), и автоматизированного синтеза можно достичь, например, с применением синтезатора пептидов ABI 43 IA (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя.

[314] Способы твердофазного химического синтеза пептидов были известны в данной области техники с начала 1960-х годов (Merrifield, R.B., "Solid-phase synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (См. также публикацию Stewart, J.M. and Young, J.D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, 111., pp. 11-12)), и в последнее время их применяли в коммерчески доступных наборах для синтеза и разработки пептидов в лабораторных условиях (Cambridge Research Biochemicals). В таких коммерчески доступных лабораторных наборах, как правило, использовали учения Н.М. Geysen et al., "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid," *Proc. Natl. Acad. Set, USA*, 81:3998, 1984, и обеспечивали синтез пептидов на кончиках множества «стержней» или «шпилек», все из которых соединены с одним планшетом. При применении такой системы планшет, содержащий стержни или шпильки, переворачивают и вставляют во второй планшет с соответствующими лунками или резервуарами, которые содержат растворы для присоединения или прикрепления соответствующей аминокислоты к кончикам стержней или шпилек. Повторяя данную стадию процесса, т.е. переворачивая и вставляя кончики стержней и шпилек в соответствующие растворы, аминокислоты встраивают в нужные пептиды. Кроме того, существует ряд доступных систем для осуществления синтеза пептидов с применением ФМОС. Например, сборку полипептида или фрагмента можно осуществить на твердой подложке с применением автоматизированного пептидного синтезатора Model 431 A™ от компании Applied Biosystems, Inc. Такое оборудование обеспечивает свободный доступ к пептидам согласно настоящему описанию либо

посредством прямого синтеза, либо посредством синтеза ряда фрагментов, связывание которых можно осуществить с применением других известных методик.

[315] Условно активные полипептиды также можно гликозилировать.

Гликозилирование можно осуществить посттрансляционным способом либо химически, либо при помощи механизмов клеточного биосинтеза, причем последний включает применение известных мотивов гликозилирования, которые могут быть нативными для последовательности или которые можно добавить в качестве пептида либо добавить в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты. Гликозилирование может быть О-связанным или N-связанным.

[316] Условно активные полипептиды включают все формы «миметиков» и «пептидомиметиков». Термины «миметик» и «пептидомиметик» относятся к синтетическому химическому соединению, которое по существу характеризуется теми же структурными и/или функциональными характеристиками полипептидов согласно настоящему описанию. Миметик может либо полностью состоять из синтетических, неприродных аналогов аминокислот, либо может представлять собой химерную молекулу частично природных пептидных аминокислот и частично неприродных аналогов аминокислот. Миметик может также содержать любое количество консервативных замен природных аминокислот при условии, что такие замены также по существу не изменяют структуру и/или активность миметика. Как и в случае полипептидов согласно настоящему описанию, которые являются консервативными вариантами, проведение обычных экспериментов определит, находится ли миметик в пределах объема указанного описания, т.е., что его структура и/или функция по существу не изменены.

[317] Композиции миметиков полипептидов согласно настоящему описанию могут содержать любую комбинацию неприродных структурных компонентов. Согласно альтернативному аспекту композиции миметиков согласно настоящему описанию содержат одну или все из следующих трех структурных групп: а) группы сцепления остатков, отличные от природных амидных связей («пептидных связей»); b) неприродные остатки вместо природных остатков аминокислот или c) остатки, которые индуцируют вторичную структурную мимикрию, т.е. индуцируют или стабилизируют вторичную структуру, например, конформацию бета-поворота, гамма-поворота, бета-слоя, альфа-спирали и т.п. Например, полипептид согласно настоящему описанию можно охарактеризовать как миметик, когда все или несколько его остатков соединены химическим путем, а не природными пептидными связями. Отдельные остатки пептидомиметиков можно соединить посредством пептидных связей, других химических связей или посредством сопряжения, такого как, например, с применением глутаральдегида, N-гидроксисукцинимидных эфиров, бифункциональных малеимидов, N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) или N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC). Связывающие группы, которые могут являться альтернативой традиционным амидным связям («пептидным связям»), включают, например, кетометилен (например, $-(C=O)CH_2-$ для $-(C=O)-NH-$), аминометилен (CH_2-NH), этилен, олефин ($CH=CH$), эфир (CH_2-O), тиоэфир (CH_2-S), тетразол (CN_4--), тиазол, ретроамид, тиоамид или сложный эфир (см., например, публикацию Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.7, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, N. Y.).

[318] Полипептид согласно настоящему описанию также можно охарактеризовать как миметик, содержащий все или некоторые неприродные остатки вместо природных аминокислотных остатков. Неприродные остатки хорошо описаны в научной и патентной литературе; несколько примеров природных композиций, подходящих в

качестве миметиков остатков природных аминокислот, и руководящие принципы описаны ниже. Миметики ароматических аминокислот можно получить путем замены, например, D- или L-нафилаланина; D- или L-фенилглицина; D- или L-2-тиенилаланина; D- или L-1,2,3- или 4-пиренилаланина; D- или L-3-тиенилаланина; D- или L-(2-пиридинил) аланина; D- или L-(3-пиридинил)аланина; D- или L-(2-пиразинил)аланина; D- или L-(4-изопропил)фенилглицина; D-(трифторметил)фенилглицина; D-(трифторметил) фенилаланина; D-*n*-фторфенилаланина; D- или L-*n*-бифенилфенилаланина; D- или L-*n*-метоксибифенилфенилаланина; D- или L-2-индол(алкил)аланинов и D- или L- алкиланинов, где алкил может быть замещенным или незамещенным метилом, этилом, пропилем, гексилем, бутилом, пентилом, изопропилом, изобутилом, втор-изотиолом, изопентилом или некислыми аминокислотами. Ароматические кольца неприродной аминокислоты включают, например, тиазолил, тиофенил, пиразолил, бензимидазолил, нафтил, фуранил, пирролил и пиридиловые ароматические кольца.

[319] Миметики кислых аминокислот можно получить путем замены, например, некарбоксилатными аминокислотами при сохранении отрицательного заряда; (фосфоно) аланином; сульфатированным треонином. Карбоксильные боковые группы (например, аспартил или глутамил) можно также селективно модифицировать посредством реакции с карбодиимидами ($R'-N-C(=O)-N-R'$), такими как, например, 1-циклогексил-3(2-мофолинил-(4-этил)карбодиимид или 1-этил-3(4-азоний-4,4-диметолпентил)карбодиимид. Аспартил или глутамил также можно преобразовать в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония. Миметики основных аминокислот можно получить путем замены, например (в дополнение к лизину и аргинину), аминокислотой орнитином, цитруллином или (гуанидино)уксусной кислотой или (гуанидино) алкилуксусной кислотой, где алкил определен выше. Производное нитрила (например, содержащее CN-фрагмент вместо COOH) можно заместить на аспарагин или глутамин. Аспарагинильные и глутаминильные остатки можно дезаминировать до соответствующих аспартильных или глутамильных остатков. Миметики аргининового остатка можно получить посредством взаимодействия аргинила, например, с одним или несколькими обычными реагентами, включая, например, фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион или нингидрин, предпочтительно, в щелочных условиях. Миметики тирозиновых остатков можно получить посредством взаимодействия тирозила, например, с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. N-ацетилимидизол и тетранитрометан можно применять для получения O-ацетил-тирозильных и 3-нитропроизводных соединений, соответственно. Миметики цистеиновых остатков можно получить посредством взаимодействия цистеиниловых остатков, например, с альфа-галогенацетатами, такими как 2-хлоруксусная кислота или хлорацетамид, и соответствующими аминами с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Миметики цистеиновых остатков также можно получить посредством взаимодействия цистеиниловых остатков, например, с бромтрифторацетоном, альфа-бром-бета-(5-имидозоил)пропионовой кислотой; хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом; метил-2-пиридилдисульфидом; п-хлорртутьбензоатом; 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензоокса-1,3-диазолом. Можно получить миметики лизина (и можно изменить аминоконцевые остатки) посредством взаимодействия лизинила, например, с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Миметики лизина и других альфа-аминосодержащих остатков также можно получить посредством взаимодействия с имидоэфирами, такими как метилпиколинимидат, пиридоксальфосфат, пиридоксаль, хлорборгидрид, тринитробензолсульфоновая кислота, O-метилизомочевина, 2,4-

пентандион, и посредством катализируемых трансамидазой реакций с глиоксилатом. Миметики метионина можно получить посредством осуществления реакции, например, с метионинсульфоксидом. Миметики пролина включают, например, пипеколиновую кислоту, тиазолидинкарбоновую кислоту, 3- или 4-гидроксипролин, дегидропролин, 3- или 4-метилпролин или 3,3-диметилпролин. Миметики гистидиновых остатков можно получить посредством взаимодействия гистидила, например, с диэтилпрокарбонатом или парабромфенацилбромидом. Другие миметики включают, например, таковые, которые получают путем гидроксирования пролина и лизина; фосфорилирования гидроксильных групп серильных или треонильных остатков; метилирования альфа-аминогрупп лизина, аргинина и гистидина; ацетилирования N-концевого амина; метилирования остатков амидов основной цепи или замены на N-метиламинокислоты либо амидирования C-концевых карбоксильных групп.

[320] Остаток, например, аминокислоту, полипептида согласно настоящему описанию также можно заменить аминокислотой (или остатком миметика пептида) противоположной хиральности. Таким образом, любую аминокислоту, встречающуюся в природе в L-конфигурации (которая также может упоминаться как R или S, в зависимости от структуры химического объекта), можно заменить аминокислотой того же химического структурного типа или миметиком пептида, но противоположной хиральности, называемой D-аминокислотой, однако ее также можно назвать R- или S-формой.

[321] В настоящем описании также предложены способы модификации условно активных полипептидов либо посредством естественных процессов, таких как посттрансляционная обработка (например, фосфорилирование, ацилирование и т.д.), либо при помощи методов химической модификации. Модификации могут происходить в любой области полипептида, включая остов пептида, боковые цепи аминокислот и амино- или карбоксильные концы. Понятно, что такой же тип модификации может присутствовать в той же или различной степени в нескольких участках данного полипептида. Также данный полипептид может содержать множество модификаций. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, ПЭГилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гем-фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, циклизацию с поперечным сшиванием, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, формирование ГФИ-якоря (якоря гликозилфосфатидилинозитола), гидроксирование, иодирование, метилирование, миристилирование, окисление, ПЭГилирование, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование и опосредованное переносом РНК добавление аминокислот в белок, такое как аргилирование. См., например, публикацию Creighton, T.E., a s-Structure and Molecular Properties 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983).

Н. Конструирование условно активных антител

[322] Условно активные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать посредством одной или нескольких методик конструирования антител, описанных в настоящем документе. Неограничивающие примеры методик

конструирования антител включают конъюгацию антител, конструирование мультиспецифичных антител, конструирование биспецифичного условно активного антитела против антигена поверхности иммунной эффекторной клетки и антигена-мишени, а также конструирование Fc-области антител.

5 [323] Подходящие способы конъюгации условно активных антител были описаны в публикации WO 2015/175375. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения условно активное антитело, применяемое для конъюгации, раскрытое в
10 настоящем описании, предпочтительным образом характеризуется отношением активности при аберрантном условии к активности при нормальном физиологическом условии по меньшей мере приблизительно 10:1, или по меньшей мере приблизительно 12:1, или по меньшей мере приблизительно 14:1, или по меньшей мере приблизительно 16:1, или по меньшей мере приблизительно 18:1, или по меньшей мере приблизительно 20:1, или по меньшей мере приблизительно 22:1, или по меньшей мере приблизительно 24:1, или по меньшей мере приблизительно 26:1.

15 [324] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно активные антитела можно конъюгировать в Fc-области антител. Способные к конъюгации молекулы, соединения или лекарственные средства, описанные выше, можно конъюгировать с Fc-областью, как описано в патенте США №8,362,210. Например, Fc-область можно конъюгировать с цитокином или токсином, доставку
20 которого следует осуществить на участок, в котором условно активные антитела проявляют преимущественную активность. Способы конъюгации полипептидов с Fc-областью антител известны в данной области. См., например патенты США №№5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, 5,723,125, 5,783,181, 5,908,626, 5,844,095 и 5,112,946; публикации EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; WO 91/06570, WO
25 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 и WO 99/04813; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, pages 10535-10539, 1991; Traunecker et al., Nature, vol. 331, pages 84-86, 1988; Zheng et al., J. Immunol, vol. 154, pages 5590-5600, 1995; и Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, pages 11337-11341, 1992.

[325] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно
30 активное антитело можно ковалентно присоединить к конъюгированному средству через промежуточный линкер, содержащий по меньшей мере две реакционноспособные группы, одна для взаимодействия с условно активным антителом и одна для взаимодействия с конъюгированным средством. Линкер, который может включать любое совместимое органическое соединение, можно выбрать таким образом, чтобы
35 реакция с условно активным антителом или конъюгированным средством не оказывала неблагоприятного воздействия на реакционную способность и/или селективность условно активного антитела. Более того, присоединение линкера к конъюгированному средству может не нарушать активность конъюгированного средства. Соотношение молекул противоракового средства, конъюгированного с молекулами условно активного
40 полипептида, составляет до 3:1, или 4:1, или 5:1, или 6:1. В одном примере отношение противоракового средства к условно активному полипептиду составляет приблизительно 4:1.

[326] Подходящие линкеры для окисленных условно активных антител включают
45 таковые, которые содержат группу, выбранную из первичных аминов, вторичных аминов, гидразина, гидразида, гидроксиламинов, фенилгидразина, семикарбазида и тиосемикарбазидных групп. Подходящие линкеры для восстановленных условно активных антител включают таковые, которые содержат определенные реакционноспособные группы, способные к взаимодействию с сульфгидрильной группой

восстановленного условно активного антитела. Такие реакционноспособные группы включают, без ограничения: реакционноспособные галогеналкильные группы (включая, например, галоацетильные группы), *n*-ртутьбензоатные группы и группы, способные к реакциям присоединения Майкла (включая, например, малеимиды и группы указанного типа, описанного в публикации Mitra and Lawton, J. Amer. Chem. Soc. Vol.101, pages 3097-3110, 1979).

[327] Подходящие способы конструирования мультиспецифичных условно активных антител были описаны в публикации WO 2015/175375.

[328] Условно активное антитело можно сконструировать для получения биспецифичного условно активного антитела против антигена поверхности иммунной эффекторной клетки и антигена-мишени. Биспецифичные условно активные антитела согласно настоящему изобретению могут привлекать иммунную эффекторную клетку к пораженному заболеванием участку с присутствующим в нем антигеном-мишенью. Биспецифичное условно активное антитело представляет собой антитело, которое может специфичным образом связываться с двумя различными антигенами: антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки и антигеном-мишенью. Биспецифичное антитело может представлять собой полноразмерное антитело, содержащее два плеча, одно из которых связывается с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки, а другое связывается с антигеном-мишенью. Биспецифичное антитело может представлять собой фрагмент антитела, содержащий только переменные домены тяжелой цепи (V_H) и переменные домены легкой цепи (V_L). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фрагмент антитела содержит по меньшей мере две единицы $V_H V_L$: одна для связывания с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки, а другое плечо для связывания с антигеном-мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное условно активное антитело содержит два scFv: один связывается с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки, а другой связывается с антигеном-мишенью.

[329] Привлеченная иммунная эффекторная клетка с ее активностью связывания как по отношению к иммунной эффекторной клетке, так и к антигену-мишени на пораженной заболеванием клетке или пораженной заболеванием ткани, может привлекать иммунную эффекторную клетку к пораженным заболеванием клеткам или пораженным заболеванием тканям, содержащим антиген-мишень. Затем привлеченная иммунная эффекторная клетка атакует пораженные заболеванием клетки или пораженные заболеванием ткани, тем самым способствуя излечиванию заболевания, поскольку иммунная эффекторная клетка способна подавлять или даже разрушать пораженные заболеванием клетки или пораженную заболеванием ткань. Например, иммунные эффекторные клетки могут разрушать опухолевые клетки или инфицированные клетки. Иммунные эффекторные клетки включают природные клетки-киллеры, макрофаги, клетки-киллеры, активируемые лимфокином (lymphokine-activated killer, LAK), и Т-клетки.

[330] Биспецифичное условно активное антитело обладает двумя связывающими активностями, по одной в отношении антигена поверхности иммунных эффекторных клеток и антигена-мишени. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения обе связывающие активности являются условными, что означает, что величины связывающей активности биспецифичного условно активного антитела с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки и антигеном-мишенью ниже, чем величина связывающей активности родительского антитела при нормальном физиологическом условии, и выше, чем величина связывающей активности

родительского антитела при аберрантном условии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения только одна из двух связывающих активностей является условной, что означает, что либо связывающая активность биспецифичного условно активного антитела с антигеном поверхности иммунных эффекторных клеток, либо связывающая активность биспецифичного условно активного антитела с антигеном-мишенью является условной. В данном случае одна из связывающей активности биспецифичного условно активного антитела по отношению к антигену поверхности эффекторной клетки или связывающей активности биспецифичного условно активного антитела по отношению к антигену-мишени является более низкой, чем соответствующая активность родительского антитела при нормальном физиологическом условии, и превышает соответствующую активность родительского антитела при аберрантном условии.

[331] Два плеча (например, две единицы $V_H V_L$ или два scFv) в биспецифичном условно активном антителе можно соединить при помощи обычных способов. Как хорошо известно в данной области техники, минимальный фрагмент антитела, содержащий полный сайт связывания антигена, содержит димер переменного домена одной тяжелой и одной легкой цепи (V_H и V_L) в нековалентной ассоциации. Данная конфигурация соответствует той, которая обнаружена в нативных антителах, где три определяющих комплементарность участка (CDR) каждого переменного домена взаимодействуют с определением сайта связывания антигена на поверхности димера $V_H V_L$. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Каркасные участки (FR), фланкирующие CDR, имеют третичную структуру, которая по существу является консервативной в нативных иммуноглобулинах у видов, различных настолько, как человек и мышь. Данные FR служат для удержания CDR в их соответствующей ориентации. Константные домены не требуются для функции связывания, однако они могут способствовать стабилизации взаимодействия $V_H V_L$. Даже отдельный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичные для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя обычно с более низким сродством, чем весь сайт связывания (Painter et al., "Contributions of heavy and light chains of rabbit immunoglobulin G to antibody activity. I. Binding studies on isolated heavy and light chains," Biochemistry, vol. 11 pages 1327-1337, 1972). Следовательно, указанный домен сайта связывания биспецифичного условно активного антитела можно сконструировать как пару доменов $V_H V_L$, $V_H V_H$ или $V_L V_L$ различных иммуноглобулинов.

[332] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное условно активное антитело можно сконструировать в виде непрерывной полипептидной цепи при помощи методов рекомбинантной ДНК, например, таким образом, чтобы экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей биспецифичное условно активное антитело, осуществлялась для конструирования непрерывной полипептидной цепи (например, см. публикацию Mack et al., "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, pages 7021-7025, 2005). Порядок доменов V_H и V_L в полипептидной цепи не является критическим для настоящего изобретения, если домены V_H и V_L расположены так, что сайты связывания антигена могут надлежащим образом складываться с образованием одного сайта связывания для антигена поверхности иммунной эффекторной клетки и одного сайта связывания для антигена-мишени.

[333] Некоторые из методик, описанных в настоящем документе для конструирования

мультиспецифичных условно активных антител, можно применять для получения биспецифичных условно активных антител против антигена поверхности иммунной эффекторной клетки и антигена-мишени.

[334] Биспецифичные антитела можно сконфигурировать в виде отдельной полипептидной цепи, как описано в публикациях WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Bruhl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426. В особенности предпочтительной конфигурацией для биспецифичного антитела является полипептидная конструкция, в которой области V_H и V_L связаны друг с другом посредством линкерного домена. Порядок областей V_H и V_L в отдельной полипептидной цепи не является критическим. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отдельная полипептидная цепь сконфигурирована как V_{H1} -линкерный домен- V_{L1} -линкерный домен- V_{H2} -линкерный домен- V_{L2} . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отдельная полипептидная цепь сконфигурирована как V_{L1} -линкерный домен- V_{H1} -линкерный домен- V_{L2} -линкерный домен- V_{H2} . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отдельная полипептидная цепь сконфигурирована как V_{H1} -линкерный домен- V_{H2} -линкерный домен- V_{L1} -линкерный домен- V_{L2} . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отдельная полипептидная цепь сконфигурирована как V_{H1} -линкерный домен- V_{L2} -линкерный домен- V_{L1} -линкерный домен- V_{H2} . Отдельная полипептидная цепь может укладываться в два плеча, каждое из которых способно связываться с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки или антигеном-мишенью.

[335] Линкерный домен в биспецифичном условно активном антителе является фрагментом пептида, достаточно длинным, чтобы способствовать межмолекулярной ассоциации между данными доменами V_H и V_L . Конструкция линкеров, подходящих для данной цели, описана в предшествующем уровне техники, например, в публикации EP 623679 B1, патенте США №5258498, публикации EP 573551 B1 и патенте США №5525491. Линкерный домен, предпочтительно, представляет собой гидрофильный гибкий линкер, содержащий от 1 до 25 аминокислот, выбранных из глицина, серина и/или глицина/серина. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения линкерный домен представляет собой линкер из 15 аминокислот последовательности (Gly4Ser)₃.

[336] Дополнительные линкерные домены включают домены олигомеризации. Домены олигомеризации могут способствовать комбинированию двух или нескольких доменов V_H и V_L , укладывающихся в два плеча, каждое из которых способно связываться с антигеном поверхности иммунной эффекторной клетки или антигеном-мишенью. Неограничивающие примеры доменов олигомеризации включают лейциновые молнии (например, jun-fos, GCN4, E/EBP, Kostelny, J. Immunol. 148 (1992), 1547-1553; Zeng, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997), 3673-3678, Williams, Genes Dev. 5 (1991), 1553-1563; Suter, "Phage Display of Peptides and Proteins", Chapter 11, (1996), Academic Press), домены олигомеризации, полученные из антител, такие как константные домены CH1 и CL (Mueller, FEBS Letters 422 (1998), 259-264) и/или домены тетрамеризации, такие как GCN4-LI (Zerangue, Proc. Natl., Sci., 97 (2000), 3591-3595).

[337] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для стабилизации укладки отдельной полипептидной цепи биспецифичного условно активного антитела можно применять технологию «выступ-во-впадину» (knob-in-hole).

Технология «выступ-во-впадину» описана в публикации Ridgway et al. ("Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization," *Protein Eng.* 1996 Jul; 9(7):617-21). Данный подход применяли для упаковки боковых цепей аминокислот соседних α -спиралей, где боковые цепи остатков в α -спирали представлены как
 5 разнесенные в пространстве выступы на поверхности цилиндра, чередующиеся с отверстиями, которым могли бы соответствовать выступы соседних α -спиралей (O'Shea et al., (1991) *Science*, 254, 539-544).

[338] Антигены поверхности иммунных эффекторных клеток должны быть специфичными к одной иммунной эффекторной клетке или к классу иммунных
 10 эффекторных клеток. Известны антигены поверхности для многих иммунных эффекторных клеток. Природные клетки-киллеры содержат антигены поверхности, включая CD56, CD8, CD 16, рецепторы семейства KIR, NKp46, NKp30, CD244 (2B4), CD 161, CD2, CD7, CD3 и иммуноглобулин-подобные рецепторы клеток-киллеров (Angelis et al., "Expansion of CD56-negative, CD16-positive, KIR-expressing natural killer cells after T
 15 cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation," *Acta Haematol.* 2011; 126 (1):13-20; Dalle et al., "Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections," *Pediatric Research* (2005) 57, 649-655; Agarwal et al., "Roles and Mechanism of Natural Killer Cells in Clinical and Experimental Transplantation," *Expert Rev Clin Immunol.* 2008; 4(1):79-91).

[339] Макрофаги содержат антиген поверхности, включая CD11b, F4/80, CD68, CSF1R, MAC2, CD11c, LY6G, LY6C, IL-4R α , CD163, CD14, CD11b, F4/80 (мышь)/EMR1 (человек), CD68 и MAC-1/MAC-3, PECAM-1 (CD31), CD62, CD64, CD45, Ym1, CD206, CD45RO, 25F9, S100A8/A9 и PM-2K (Murray et al., "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nature Reviews Immunology*, 11, 723-737; Taylor et al., "Macrophage receptors and immune
 25 recognition," *Annu Rev Immunol* 2005; 23:901-44; Pilling, et al., "Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts," *PLoS ONE* 4(10): e7475. doi:10.1371/journal.pone.0007475, 2009).

[340] Активируемые лимфокином клетки-киллеры (LAK) содержат антиген поверхности, включая T3, T4, T11, T8, TII, Leu7, Leu11 (Ferrini et al., "Surface markers of
 30 human lymphokine-activated killer cells and their precursors," *Int J Cancer.* 1987 Jan 15; 39(1): 18-24; Bagnasco et al., "Glycoproteic nature of surface molecules of effector cells with lymphokine-activated killer (LAK) activity," *Int J Cancer.* 1987 Jun 15; 39(6):703-7; Kaufmann et al., "Interleukin 2 induces human acute lymphocytic leukemia cells to manifest lymphokine-activated-killer (LAK) cytotoxicity," *The Journal of Immunology*, August 1, 1987, vol. 139 no. 3 977-982).

[341] Т-клетки, в особенности, цитотоксические Т-клетки, содержат антиген поверхности, включая CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, T58, CD27, CD45, CD84, CD25, CD127 и CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CD62L, CD69, TCR, T10, T11 и CD45RO (Ledbetter et al., "Enhanced transmembrane signaling activity of monoclonal antibody
 40 heteroconjugates suggests molecular interactions between receptors on the T cell surface," *Mol Immunol.* 1989 Feb; 26(2): 137-45; Jondal et al., "SURFACE MARKERS ON HUMAN T AND B LYMPHOCYTES," *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, VOLUME 136, 1972, 207-215; Mingari et al., "Surface markers of human T lymphocytes," *Ric Clin Lab.* 1982 Jul-Sep; 12(3):439-448).

[342] Биспецифичное условно активное антитело после связывания с иммунной
 45 эффекторной клеткой может доставить иммунную эффекторную клетку к клетке или ткани, в которых присутствует антиген-мишень, предпочтительно, на поверхности. Как только биспецифичное условно активное антитело (с иммунной эффекторной клеткой) связывается с антигеном-мишенью, иммунная эффекторная клетка может

атаковать пораженную заболеванием клетку или пораженную заболеванием ткань. Иммунные эффекторныe клетки, такие как природные клетки-киллеры, макрофаги, клетки LAK, Т-клетки (цитотоксические), способны вызывать гибель пораженной заболеванием клетки или ткани и/или разрушить ее, например, разрушая опухолевую

[343] Пораженные заболеванием клетки или пораженную заболеванием ткань можно выбрать из рака, воспалительного заболевания, нейрональных расстройств, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний или инфекционных заболеваний. Примеры антигенов-мишеней включают антигены, экспрессия которых осуществляется различными иммунными клетками, карциномами, саркомами, лимфомами, лейкозом, герминогенными опухолями, бластомами и клетками, ассоциированными с различными гематологическими заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями.

[344] Антигены-мишени, специфичные для рака, на которые может быть нацелено биспецифичное условно активное антитело, включают один или несколько из 4-1BB, 5T4, антигена аденокарциномы, альфа-фетопротеина, BAFF, клеток В-лимфомы, C242-антигена, CA-125, карбоангидразы 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, РЭФР, ЕpCAM, CD3, FAP, дополнительного домена-В фибронектина, рецептора фолата 1, GD2, GG3 ганглиозида, гликопротеина 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, рецепторной киназы фактора роста гепатоцитов человека, рецептора ИФР-1, ИФР-I, IgG1, LI-CAM, ИЛ-13, ИЛ-6, рецептора инсулиноподобного фактора роста I, интегрина $\alpha 5\beta 1$, интегрина $\alpha v\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцина CanAg, N-гликолилнейраминовой кислоты, NPC-1C, РФРТ-а, PDL192, фосфатидилсерина, клеток карциномы предстательной железы, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенаскина C, ТФР-бета 2, ТФР- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевого антигена CTAА16.88, ФРЭС-А, РФРЭС-1, РФРЭС2 или виментина.

[345] Типы раков, подвергаемые лечению при помощи генно-инженерных цитотоксических клеток или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, включают карциному, бластоу и саркому, а также определенные лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, а также злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Типы рака могут представлять собой опухоли, отличные от солидных опухолей (такие как гематологические опухоли), или солидные опухоли. Также включены опухоли/типы рака взрослых и опухоли/типы рака детей.

[346] Гематологические типы рака представляют собой типы рака крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) типов рака включают лейкозы, включая острый лейкоз (такой как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, примиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (медленно растущую форму и форму с высокой степенью злокачественности), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, лейкоз ворсистых клеток и миелодисплазию.

[347] Сoлидные опухоли представляют собой абнормальную массу ткани, которая,

как правило, не содержит цист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей называют по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, которые подвергаются лечению, включают

5 саркомы и карциномы, включая фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, леймиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидные злокачественные опухоли, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, гепатоклеточную карциному,

10 плоскоклеточный рак, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному слюнных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков,

15 хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома мозгового ствола и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, краниофарингиома Шваннома, эпендимомы, пинеаломы,

20 гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиомы, менингиомы, нейробластома, ретинобластома и метастазы головного мозга).

[348] Антигены-мишени, специфичные для воспалительных заболеваний, на которые может нацеливаться биспецифичное условно активное антитело, включают один или несколько из AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксина-1), CD125, CD147 (базигина),

25 CD 154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (IgE-рецептора), CD25 (цепи рецептора ИЛ-2), CD3, CD4, CD5, ИФН- α , ИФН- γ , IgE, Fc-области IgE, ИЛ-1, ИЛ-12, ИЛ-23, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-17A, ИЛ-22, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, рецептора ИЛ-6, интегрин $\alpha 4 \beta 7$, антигена ламы Lama glama, LFA-1 (CD11a), MEDI-528, миостатина, OX-40, rhuMAb $\beta 7$, склероцина, SOST, ТФР бета-1, ФНО- α или ФРЭС-А.

30 [349] Антигены-мишени, специфичные для нейрональных расстройств, на которые могут нацеливаться биспецифичные условно активные антитела согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из бета-амилоида или MABT5102A. Антигены, специфичные для диабета, на которые может нацеливаться биспецифичное условно активное антитело согласно настоящему изобретению, включают один или

35 несколько из L-I β или CD3. Антигены, специфичные для сердечно-сосудистых заболеваний, на которые может нацеливаться биспецифичное условно активное антитело согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из C5, кардиального миозина, CD41 (интегрин α -lib), фибрина II, бета-цепи, ITGB2 (CD18) и сфингозин-1-фосфата.

40 [350] Антигены-мишени, специфичные для инфекционных заболеваний, на которые может нацеливаться биспецифичное условно активное антитело согласно настоящему изобретению, включают один или несколько из токсинов сибирской язвы, CCR5, CD4, фактора агглютинации А, цитомегаловируса, гликопротеина В цитомегаловируса, эндотоксина, Escherichia coli, антигена поверхности вируса гепатита В, вируса гепатита В, ВИЧ-1, Hsp90, гемагглютинина вируса гриппа А, липотейхоевой кислоты, Pseudomonas aeruginosa, гликопротеина вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса и ФНО- α .

[351] Другие примеры антигенов-мишеней включают белки поверхности,

обнаруживаемые на раковых клетках специфичным или амплифицированным способом, например, рецептор ИЛ-14, CD19, CD20 и CD40 для В-клеточной лимфомы, антигены Левис Y и СЕА для различных карцином, антиген Tag72 для рака молочной железы и рака толстой и прямой кишок, РЭФР для рака легких, фолатсвязывающий белок и белок HER-2, амплификация которого часто происходит при карциноме молочной железы человека и карциноме яичников, или вирусные белки, например, белки Gp120 и gp41 оболочки ВИЧ, белки оболочки, полученные из вирусов гепатита В и С, гликопротеин В и другие гликопротеины оболочки цитомегаловируса человека и белки оболочки, полученные из онковирусов, таких как ассоциированный с саркомой Капоши вирус герпеса. Другие потенциальные антигены-мишени включают CD4, где лиганд представляет собой гликопротеин gp120 оболочки ВИЧ, и другие вирусные рецепторы, например, ICAM, который является рецептором риновируса человека, и связанную с ним рецепторную молекулу для полиовируса.

[352] Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) не может проникать в клетки человека до тех пор, пока он не свяжется с двумя ключевыми молекулами на поверхности клетки, CD4 и корецептором. Корецептором, который изначально распознается, является CCR5, позже в жизненном цикле вируса корецептором для ВИЧ-1 становится другой хемокиновый рецептор CXCR4 (D'Souza, Nature Med., 2, 1293 (1996), Premack, Nature Med. 2, 1174, Fauci, Nature 384,529 (1996)). Штаммы ВИЧ-1, которые вызывают наибольшую передачу вирусов при половом контакте, называют М-тропными вирусами. Данные штаммы ВИЧ-1 (также известные как первичные вирусы, не характеризующиеся синцитийиндуцирующей способностью (non-syncytia inducing, (NSI)), могут реплицироваться в первичных CD4+ Т-клетках и макрофагах и использовать хемокиновый рецептор CCR5 (и реже CCR3) в качестве своих корецепторов. Т-тропные вирусы (иногда называемые первичными вирусами, характеризующимися синцитийиндуцирующей способностью (syncytia inducing, SI)), также могут реплицироваться в первичных CD4+ Т-клетках, но могут дополнительно инфицировать установившиеся линии CD4+ Т-клеток *in vitro* посредством хемокинового рецептора CXCR4 (фузин). Многие из данных Т-тропных штаммов могут использовать CCR5 в дополнение к CXCR4, а некоторые могут вводить макрофаги через CCR5 по меньшей мере при определенных условиях *in vitro* (D'Souza, Nature Med., 2, 1293 (1996), Premack, Nature Med. 2, 1174, Fauci, Nature 384,529 (1996)). Поскольку штаммы М-тропного ВИЧ-1 присутствуют в приблизительно 90% случаях передачи ВИЧ половым путем, CCR5 представляет собой преобладающий корецептор для вируса у пациентов.

[353] Число и идентичность молекул корецептора на клетках-мишенях и способность штаммов ВИЧ-1 с вероятностью проникать в клетки через различные корецепторы, по-видимому, являются критическими детерминантами прогрессирования заболевания. Высокие уровни экспрессии CCR3 и CCR5 также наблюдались в Т-клетках и В-клетках лимфатических узлов у пациентов с болезнью Ходжкина. Считают, что диабет I типа является аутоиммунным заболеванием, опосредованным Т-клетками. Экспрессию рецептора CCR5 в поджелудочной железе связывали с прогрессированием диабета I типа в соответствующих моделях на животных (Cameron (2000) J. Immunol., 165, 1102-1110). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифичное условно активное антитело связывается с CCR5 в качестве антигена-мишени, и его можно применять для подавления ВИЧ-инфекции клеток-хозяев, а также для замедления прогрессирования других заболеваний

[354] Несколько антител, специфичным образом связывающихся с CCR5 (человека), известны в данной области техники и включают MC-1 (Mack (1998) J. Exp.Med. 187,

1215-1224) или MC-5 (Blanpain 13:723-37, Segerer (1999) *Kidney Int.* 56:52-64, Kraft (2001) *Biol. Chem.* 14; 276:34408-18). Поэтому предпочтительно, чтобы биспецифичное условно активное антитело содержало, например, V_L и V_H-домены антитела (т.е. полученный из Ig второй домен), специфичного в отношении CCR5, предпочтительно, CCR5 человека, и V_H и V_L-домены антитела, специфичного в отношении CD3-антигена на Т-клетках.

[355] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифичное условно активное антитело против CD3 на Т-клетках и CD19 в качестве антигена-мишени. CD19 оказался весьма подходящей медицинской мишенью. Экспрессия CD19 осуществляется во всей линии В-клеток от про-В-клетки до зрелой В-клетки, а также равномерно происходит на всех клетках лимфомы, но отсутствует в стволовых клетках (Haagen, *Clin. Exp. Immunol.* 90 (1992), 368-75, Uckun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 8603-7). Для лечения злокачественных новообразований В-клеток (в публикациях WO 02/04021, США 200200404, США №2002028178) и аутоиммунных заболеваний (в публикациях WO 02/22212, США №2002058029) раскрыта комбинированная терапия с применением как антитела, направленного против CD19, так и дополнительного иммунорегуляторного антитела. В публикации WO 00/67795 раскрыто применение антител против CD19 для лечения индолентных и агрессивных форм В-клеточных лимфом, а также острых и хронических форм лимфатических лейкозов. В публикации WO 02/80987 раскрыто терапевтическое применение иммунотоксина на основе антител против антигена CD19 для лечения таких заболеваний, как неходжкинская В-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина или В-клеточные лейкозы (например, острый В-клеточный лимфатический лейкоз (В-ОЛЛ), (например, волосатоклеточная лимфома), острый лимфатический лейкоз из В-клеток-предшественников (пре-В-ОЛЛ), В-клеточный хронический лимфатический лейкоз (В-CLL)).

[356] Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения предложено биспецифичное условно активное антитело против CD3 на Т-клетках и CD20 в качестве антигена-мишени. CD20 является одним из белков поверхности клеток, присутствующих на В-лимфоцитах. Антиген CD20 обнаруживают в здоровых и злокачественных пред-В и зрелых В-лимфоцитах, в том числе в более 90% случаях неходжкинских В-клеточных лимфом (НХЛ). Антиген отсутствует в гематopoэтических стволовых клетках, активированных В-лимфоцитах (плазматических клетках) и нормальной ткани. Было описано несколько антител, главным образом, полученных из мыши: 1F5 (Press et al., 1987, *Blood* 69/2, 584-591), 2B8/C2B8, 2H7, 1H4 (Liu et al., 1987, *J Immunol* 1998, патент США №5,736,137; Haisma et al., 1998, *Blood* 92, 184-190; Shan et al., 1999, *J. Immunol.* 162, 6589-6595).

[357] CD20 был описан в иммунотерапевтических стратегиях для лечения плазмноклеточных злокачественных новообразований с применением вакцинации ДНК, кодирующей scFv, связанный с белком-носителем (Treon et al., 2000, *Semin Oncol* 27(5), 598), и было показано, что иммунотерапевтическое лечение с применением антител против CD20 (IDEC-C2B8) является эффективным при лечении неходжкинской В-клеточной лимфомы.

[358] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное условно активное антитело представляет собой одиночную полипептидную цепь, кодируемую молекулой полинуклеотида. Полинуклеотид может представлять собой, например, ДНК, кДНК, РНК или полученную синтетическим способом ДНК или РНК, или рекомбинантным способом полученную молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую любой из данных полинуклеотидов по

отдельности либо в комбинации. Полинуклеотид может являться частью вектора, например, вектора экспрессии, включая плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги, или любой системы экспрессии, обычно применяемой в генной инженерии. Векторы могут содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые позволяют

5 отобрать вектор в подходящей клетке-хозяине и при подходящих условиях.

[359] Согласно одному аспекту полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, способствующими экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Векторы экспрессии, полученные из вирусов, таких как ретровирусы, вирус коровьей оспы, адено-ассоциированный вирус,

10 вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, можно применять для осуществления доставки полинуклеотидов или векторов в клетки млекопитающих.

Векторы, содержащие полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, можно перенести в клетку-хозяин при помощи хорошо известных способов, которые различаются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию хлоридом

15 кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как для других клеток-хозяев можно применять обработку при помощи фосфата кальция или электропорацию.

[360] Согласно другому аспекту условно активный полипептид можно сконструировать для получения биспецифичного условно активного полипептида. Способы

20 конструирования биспецифичного условно активного полипептида аналогичны способам конструирования биспецифичных условно активных антител, описанным в публикации в WO 2015/175375. Например, биспецифичный условно активный полипептид

может содержать два активных сайта, каждый из которых обладает условной активностью, т.е. является менее активным, чем родительский сайт, при нормальном физиологическом условии и является более активным, чем родительский сайт, при

25 аберрантном условии. Эволюционирование и скрининг данных двух условно активных сайтов можно проводить независимо с последующим связыванием двух активных сайтов в один и тот же биспецифичный условно активный полипептид посредством

линкера. Согласно одному аспекту линкеры, которые можно использовать в биспецифичном условно активном антителе, представляют собой известные линкеры,

30 подходящие для получения биспецифичного условно активного полипептида посредством связывания двух условно активных сайтов в условно активном полипептиде.

[361] Подходящие способы конструирования Fc-области условно активных антител были описаны в публикации WO 2015/175375.

35 [362] Подходящие способы конструирования условно активных вирусных частиц были описаны в публикации WO 2015/175375.

[363] Согласно некоторым аспектам условно активный полипептид можно встроить в вирусную частицу, которая представляет собой онколитический вирус, с применением способов, описанных в публикации WO 2015/175375. Онколитические вирусы

40 представляют собой вирусы, которые при приведении в контакт с опухолевыми клетками способны уничтожать данные опухолевые клетки. Условно активный полипептид, встроенный в онколитический вирус, может являться более активным в микроокружении опухоли, но менее активным в другом участке субъекта. Например, условно активный полипептид может являться более активным при pH или другом условии,

45 присутствующем в микроокружении опухоли (например, pH 6,2-6,8), но менее активным при pH или другом условии, присутствующем в другом месторасположении в субъекте (например, pH 7,2-7,6), таком как нормальное физиологическое условие. Условно активный полипептид, введенный в онколитический вирус, можно использовать для

облегчения доставки онколитического вируса в опухоли, где онколитический вирус может нацеливаться на опухолевые клетки и уничтожать их.

[364] Онколитические вирусы, представляющие интерес, включают аденовирус; вирус простого герпеса-1; вирус осповакцины; парвовирус; реовирус; вирус болезни Ньюкасла и т.п. Вирус осповакцины представляет особенный интерес.

[365] Согласно одному аспекту онколитический вирус выбран из группы, состоящей из парамиксовируса, реовируса, герпесвируса, аденовируса и вируса леса Симлики.

Согласно следующему аспекту парамиксовирус выбран из группы, состоящей из вируса болезни Ньюкасла (ВБН), вируса кори и вируса свинки. Согласно другому аспекту ВБН является штаммом, который выбран из группы, состоящей из МТН68/Н, РV-701 и 73-Т. [366] Согласно другому аспекту онколитический вирус выбран из герпесвируса,

реовируса, аденовируса с deletированным Е1В, вируса везикулярного стоматита и поксвирусов. Данные онколитические вирусы обладают потенциалом не только разрушать опухолевые клетки, но также высвобождать антигены из разрушенных опухолевых клеток, тем самым запуская иммунный ответ.

[367] Конкретные примеры онколитических вирусов включают, без ограничения, аденовирусы (например, Дельта-24, Дельта-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, Онух-015, ColoAd1, Н101, AD5/3-D24-GMCSF), реовирусы, вирус простого герпеса (ВПГ; OncoVEX GMCSF), вирус болезни Ньюкасла, вирусы кори, ретровирусы (например, вирусы гриппа), поксвирусы (например, вирус осповакцины, включая штаммы Копенгаген, Западный Резерв, Уайет), вирусы миксомы, рабдовирусы (например, вирус везикулярного стоматита (ВВС)), пикорнавирусы (например, вирус Сенека Валли; SW-001), вирусы коксаки и парвовирус.

[368] Согласно одному аспекту онколитический вирус представляет собой аденовирус, включая членов любого из 57 его серотипов человека (HAdV-1 - 57). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой серотип Ad5. В качестве альтернативы, аденовирус может представлять собой гибридный серотип, который может содержать или может не содержать компонент Ad5.

Неограничивающие примеры подходящих аденовирусов включают Дельта-24, Дельта-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, ONYX-015, ColoAd1, Н101 и AD5/3-D24-GMCSF. ONYX-015 представляет собой гибрид серотипов вируса Ad2 и Ad5 с делециями в областях Е1В-55К и Е3В для усиления селективности в отношении рака. Н101 представляет собой модифицированную версию Онух-015. ICOVIR-5 и ICOVIR-7 содержат делецию Rb-сайта связывания Е1 А и замену промотора Е1 А промотором Е2F. Colo Ad 1 представляет собой химерный серотип Addl lp/Ad3. AD5/3-D24-GMCSF (CGTG-102) представляет собой серотип 5/3 аденовируса с модифицированным капсидом, кодирующий ГМ-КСФ (выступ белка капсида Ad5 заменен выступом домена из серотипа 3).

[369] Согласно одному в особенности предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус представляет собой аденовирус Дельта-24 или Дельта-24-RGD. Дельта-24 описан в публикациях US 2003/0138405 А1 и US 2006/0147420 А1. Аденовирус Дельта-24 получен из аденовируса типа 5 (Ad-5) и содержит делецию размером 24 пары оснований в части CR2 гена Е1 А. Дельта-24-RGD также содержит вставку последовательности RGD-4С (которая связывается строго с интегринами $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$) в петле Н1 фибриллярного белка выступа (Pasqualini R. et al., Nat Biotechnol, 15:542-546, 1997).

[370] Онколитический аденовирус можно также дополнительно модифицировать для улучшения способности онколитического аденовируса лечить рак. Такие модификации онколитического аденовируса были описаны в публикации Jiang et al.

(Curr. Gene Ther. 2009 Oct 9(5):422-427), см. также публикацию US 2006/0147420 A1.

[371] Онколитические вирусы, содержащие условно активный полипептид, можно вводить местно или системно. Например, без ограничения, онколитические вирусы можно вводить внутрисосудистым (внутриартериальным или внутривенным),
 5 внутриопухолевым, внутримышечным, внутрикожным, интраперитонеальным, подкожным, пероральным, парентеральным, интраназальным, интратрахеальным, чрескожным, интраспинальным, внутриглазным или интракраниальным путем.

[372] Онколитические вирусы можно вводить в одном введении или в нескольких введениях. Вирус можно вводить в дозе по меньшей мере 1×10^5 бляшкообразующих
 10 единиц (БОЕ), по меньшей мере 5×10^5 БОЕ, по меньшей мере 1×10^6 БОЕ, по меньшей мере 5×10^6 или по меньшей мере 5×10^6 БОЕ, 1×10^7 , по меньшей мере 1×10^7 БОЕ, по меньшей мере 1×10^8 или по меньшей мере 1×10^8 БОЕ, по меньшей мере 1×10^8 БОЕ, по
 15 меньшей мере 5×10^8 БОЕ, по меньшей мере 1×10^9 или по меньшей мере 1×10^9 БОЕ, по меньшей мере 5×10^9 или по меньшей мере 5×10^9 БОЕ, по меньшей мере 1×10^{10} БОЕ или по меньшей мере 1×10^{10} БОЕ, по меньшей мере 5×10^{10} или по меньшей мере 5×10^{10}
 БОЕ, по меньшей мере 1×10^{11} БОЕ или по меньшей мере 1×10^{11} БОЕ, по меньшей мере
 20 1×10^{12} БОЕ или по меньшей мере 1×10^{13} БОЕ. Например, онколитический вирус можно вводить в дозе приблизительно 10^7 - 10^{13} БОЕ, приблизительно 10^8 - 10^{13} БОЕ, приблизительно 10^9 - 10^{12} БОЕ или приблизительно 10^8 - 10^{12} БОЕ.

[373] Согласно определенным аспектам рак, подлежащий лечению онколитическими
 25 вирусами, включает любую солидную опухоль, такую как рак легких, яичников, молочной железы, шейки матки, поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, кожи, гортани, мочевого пузыря и предстательной железы. Согласно одному аспекту рак представляет собой рак центральной нервной системы. Рак может представлять собой нейроэпителиальную опухоль, такую как астроцитарная опухоль (например,
 30 астроцитому, анапластическую астроцитому, глиобластому, глиосаркому, пилоидную астроцитому, гигантоклеточную астроцитому, плеоморфную ксантоастроцитому), олигодендроглиому, эпендимому, олигоастроцитому, спонгиобластому, астробластому, папиллому хориоидного сплетения, карциному хориоидного сплетения, ганглиоцитому, ганглиоглиому, нейроцитому, нейроэпителиальную опухоль, нейробластому, опухоль
 35 пинеальной области (такую как пинеоцитома, пинеобластома или смешанная пинеоцитома/пинеобластома), медуллоэпителиому, медулобластому, нейробластому или ганглионейробластому, ретинобластому или эпендимобластому. Рак может представлять собой неоплазию центральной нервной системы, такую как опухоль области турецкого седла (такую как аденома гипофиза, карцинома гипофиза или
 40 краниофарингиома), гематопоэтическую опухоль (такую как первичная злокачественная лимфома, плазмоцитома или гранулоцитарная саркома), опухоль половых клеток (такую как герминома, эмбриональная карцинома, опухоль желточного мешка, хориокарцинома, тератома или смешанная опухоль половых клеток), менингиому, мезенхимальную опухоль, меланоцитому или опухоль черепномозговых или
 45 спинномозговых нервов (такую как шваннома или нейрофиброма). Рак может представлять собой глиому низкой степени злокачественности (например, эпендимому, астроцитому, олигодендроглиому или смешанную глиому) или глиому высокой степени злокачественности (злокачественную) (например, мультиформную глиобластому). Рак может представлять собой первичную или метастатическую опухоль головного мозга.

Условно активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, можно использовать в фармацевтической композиции. Некоторые подходящие фармацевтические композиции описаны в патенте США №8,709,755 B2.

[374] Фармацевтические композиции можно применять для лечения различных типов рака, включая карциному, бластоми и саркому, а также определенные лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, а также злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Типы рака могут представлять собой опухоли, отличные от солидных опухолей (такие как гематологические опухоли), или солидные опухоли. Также включены опухоли/типы рака взрослых и опухоли/типы рака детей.

[375] Гематологические типы рака представляют собой типы рака крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) типов рака включают лейкозы, включая острый лейкоз (такой как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, примиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (медленно растущую форму и форму с высокой степенью злокачественности), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, лейкоз ворсистых клеток и миелодисплазию.

[376] Сольидные опухоли представляют собой абнормальную массу ткани, которая, как правило, не содержит цист или жидких областей. Сольидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей называют по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, которые подвергаются лечению, включают саркомы и карциномы, включая фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, леймиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидные злокачественные опухоли, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, гепатоклеточную карциному, плоскоклеточный рак, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома мозгового ствола и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, краниофарингиома Шваннома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы головного мозга).

[377] Фармацевтические композиции, содержащие условно активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, можно приготовить в состав согласно известным способам получения фармацевтических композиций. В таких способах условно активные полипептиды, как правило, сочетают со смесью, раствором или композицией, содержащей фармацевтически приемлемый

носитель.

[378] Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой материал, который может переноситься пациентом-реципиентом. Стерильный фосфатно-буферный солевой раствор является примером фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, руководство Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)). Составы могут дополнительно содержать одно или несколько вспомогательных веществ, консервантов, солюбилизаторов, забуферивающих средств, альбумин для предотвращения потери белка на поверхностях вирусов и т.д.

[379] Форма фармацевтических композиций, путь введения, доза и режим естественным образом зависят от состояния, лечение которого проводят, тяжести заболевания, возраста, массы тела и пола пациента и т.д. Специалист может принять во внимание данные соображения при приготовлении подходящих фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно приготовить в состав для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

[380] Предпочтительно, фармацевтические композиции содержат носители, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, способного быть инъектированным. Композиции могут представлять собой, в частности, изотоничные, стерильные солевые растворы (мононатрий или динатрий фосфат, натрия, калия, кальция или магния хлорид и т.п. или смеси таких солей), или сухие, в особенности, лиофилизированные композиции, которые после добавления, например, стерилизованной воды или физиологического солевого раствора, обеспечивают восстановление инъекционных растворов.

[381] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения регуляторы тоничности, иногда известные как «стабилизаторы», присутствуют для корректировки или поддержания тоничности жидкости в композиции. При применении с большими заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, регуляторы тоничности часто называют «стабилизаторами», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, посредством этого снижая возможность внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Регуляторы тоничности могут присутствовать в любом количестве от 0,1% до 25% по массе, предпочтительно, от 1 до 5% фармацевтической композиции. Предпочтительные регуляторы тоничности включают многоатомные сахароспирты, предпочтительно, трехатомные или высшие сахароспирты, такие как глицерин, эритритол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитол.

[382] Дополнительные вспомогательные вещества включают средства, которые могут выступать в качестве одного или нескольких из следующих средств: (1) объемообразующие средства, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) средства, предотвращающие денатурацию или адгезию к стенке контейнера. Такие вспомогательные вещества могут включать: многоатомные сахароспирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахароспирты, такие как сахароза, лактоза, лактитол, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибитол, миоинизитоза, миоинизитол, галактоза, галактитол, глицерол, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие средства, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тииоглицерол, а-

монотиоглицерол и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

[383] Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие средства») можно применять для облегчения солюбилизации терапевтического средства, а также для защиты терапевтического белка от вызванной встряхиванием агрегации, которые также позволяют составу подвергаться натяжению на поверхности раздела без вызывания денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в диапазоне концентраций от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл, предпочтительно, от приблизительно 0,07 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл.

[384] Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20,40, 60, 65, 80 и т.д.), полиоксамеры (184,188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.д.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированного касторового масла 10, 50 и 60, глицеролмоностеарат, сложный эфир сахарозы и жирных кислот, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно применять, включают лаурилсульфат натрия, диоктил натрия сульфосукцинат и диоктил натрия сульфонат. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

[385] Дозы, применяемые для введения, можно корректировать в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от применяемого пути введения, соответствующей патологии или, в качестве альтернативы, от желаемой длительности лечения. Для получения фармацевтических композиций эффективное количество условно активных полипептидов или продуктов, впоследствии сконструированных из условно активных полипептидов, можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

[386] Фармацевтические составы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; носители, такие как кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Во всех случаях составы должны быть стерильными и должны быть текучими до такой степени, чтобы была возможность легко набрать их в шприц. Составы должны быть стабильными в условиях изготовления и хранения и должны быть защищены от заражающего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

[387] Растворы условно активных полипептидов в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно приготовить в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом. Дисперсии также можно получить в глицероле, жидких полиэтиленгликолях, в смесях указанных веществ и в маслах. При обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

[388] Условно активные полипептиды и продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, можно приготовить в состав в композиции в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминок группами белка), которые образованы с

неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, можно также получить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды

5 натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

[389] Носитель может также представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие смеси указанных

10 веществ и растительные масла. Нужная текучесть может поддерживаться, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например,

15 парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включить изотонические вещества, например, сахара или хлорид натрия. Продолжительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством применения в композициях средств, задерживающих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[390] Стерильные инъекционные растворы получают посредством введения условно

20 активных полипептидов в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или несколькими другими компонентами, перечисленными выше, которые могут потребоваться, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают посредством введения различных стерилизованных активных компонентов

25 в стерильный наполнитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие необходимые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами их получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые позволяют получить порошок активного компонента плюс любой дополнительный желаемый

30 компонент из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизации фильтрованием.

[391] Также предусмотрено получение более концентрированных или высококонцентрированных растворов для прямой инъекции, в которых применение диметилсульфоксида (DMSO) в качестве растворителя, как предполагается, приведет к чрезвычайно быстрому проникновению, позволяющему доставить высокие

35 концентрации активных компонентов в небольшую область опухоли.

[392] После приготовления в состав растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводить во множестве лекарственных

40 форм, таких как тип инъекционных растворов, описанных выше, но также можно применять капсулы, высвобождающие лекарственное средство, и т.п.

[393] Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор должен быть соответствующим способом забуферен, при необходимости, и жидкий разбавитель сначала делают изотоничным с помощью достаточного количества физиологического

45 раствора или глюкозы. Данные специальные водные растворы в особенности пригодны для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В этой связи стерильная водная среда, которую можно применять, известна специалистам в данной области техники в свете настоящего описания. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавить к 1000 мл жидкости для

гиподермоклизиса или инъектировать в предложенный участок инфузии (см., например, руководство "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, страницы 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые изменения дозы обязательно возникнут в зависимости от состояния субъекта, лечение которого проводят. В любом случае лицо, ответственное за введение, определит соответствующую дозу для индивидуального субъекта.

[394] Условно активные полипептиды и продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, можно приготовить в состав в терапевтической смеси, чтобы доставить приблизительно от 0,0001 до 10,0 миллиграмм, или от приблизительно 0,001 до 5 миллиграмм, или от приблизительно 0,001 до 1 миллиграмм, или от приблизительно 0,001 до 0,1 миллиграмм, или от приблизительно 0,1 до 1,0, или даже приблизительно 10 миллиграмм на дозу. Также можно вводить несколько доз в выбранные интервалы времени.

[395] Помимо соединений, приготовленных в состав для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые формы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением и любые другие формы, применяемые на сегодняшний день.

[396] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения применение липосом и/или наночастиц предусмотрено для введения условно активных полипептидов или продуктов, впоследствии сконструированных из условно активных полипептидов, в клетки-хозяева. Получение и применение липосом и/или наночастиц известны специалистам в данной области техники.

[397] Нанокapsулы могут, как правило, заключать в себя соединения стабильным и воспроизводимым образом. Во избежание побочных эффектов вследствие внутриклеточной перегрузки полимерами такие сверхмелкие частицы (размером около 0,1 мкм), как правило, конструируют с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Для использования в данном изобретении предусмотрены разлагаемые биологическим способом полиалкил-цианоакрилатные наночастицы, которые удовлетворяют данным требованиям.

[398] Липосомы получают из фосфолипидов, диспергированных в водной среде и самопроизвольно образующих мультиламеллярные концентрические бислойные пузырьки (также называемые мультиламеллярными везикулами (МЛВ)). Диаметр МЛВ, как правило, составляет от 25 нм до 4 мкм. Ультразвуковая обработка МЛВ приводит к образованию малых моноламеллярных везикул (ММВ), диаметр которых находится в диапазоне от 200 до 500 А, содержащих в сердцевине водный раствор. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

[399] Фармацевтические составы, содержащие условно активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, описанных в настоящем документе, получают посредством смешивания с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенольный, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-

крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[400] Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в настоящем документе также включают средства для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как растворимые гликобелки активной в нейтральных условиях гиалуронидазы (soluble neutral-active hyaluronidase glycoproteins, sHASEGP), например, растворимые гликобелки гиалуронидазы PH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Определенные иллюстративные sHASEGP и способы их применения, включая rHuPH20, описаны в публикациях патента США №№2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному аспекту sHASEGP объединяют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

[401] Иллюстративные составы лиофилизированных антител описаны в патенте США №6,267,958. Водные составы антитела включают таковые, описанные в патенте США №6,171,586 и WO 2006/044908, последние составы включают гистидин-ацетатный буфер.

[402] Составы в настоящем документе могут также содержать более одного активного компонента, если это необходимо для конкретного показания, лечение которого проводят. Предпочтительно, компоненты с комплементарными активностями, которые не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга и могут быть объединены в одном составе. Например, помимо условно активного антитела, фрагмента антитела или иммуноконъюгата согласно настоящему изобретению может быть желательно обеспечить антагонист РЭФР (такой как эрлотиниб), антиангиогенное средство (такое как антагонист ФРЭС, который может представлять собой антитело против ФРЭС) или химиотерапевтическое средство (такое как таксоид или средство на основе платины). Такие активные компоненты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

[403] Активные компоненты могут быть инкапсулированы в микрокапсулы, полученные, например, посредством методик коацервации или межфазной полимеризации. Например, можно применять микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или из желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, в липосомах, микросферах альбумина, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

[404] Также можно получить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело или фрагмент антитела, причем указанные матрицы могут находиться в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул.

[405] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения условно

активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, можно применять для получения изделия, содержащего материалы, пригодные для лечения, предотвращения и/или диагностики описанных нарушений.

Изделие содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или 5 связанный с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, сумки для внутривенных растворов и т.д. Контейнеры могут быть образованы из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния и 10 может содержать отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, содержащий пробку, проницаемую для иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой условно активные полипептиды или продукты, впоследствии сконструированные из условно активных полипептидов 15 согласно настоящему изобретению. На этикетке или на листке-вкладыше указано, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Более того, изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит условно активные полипептиды или продукт, сконструированный из условно активного полипептида; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем 20 композицией, причем указанная композиция содержит дополнительное цитотоксичное или иное терапевтическое средство. Изделие согласно данному варианту реализации настоящего изобретения может также содержать листок-вкладыш, в котором указано, что композицию можно применять для лечения конкретного нарушения. В качестве альтернативы или дополнительно, изделие может также содержать второй (или третий) 25 контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (bacteriostatic water for injection, BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, изделие может содержать другие необходимые с коммерческой и потребительской точки зрения материалы, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[406] Изделие может необязательно содержать контейнер как компонент устройства или системы для парентеральной, подкожной, внутримышечной, внутривенной, 30 внутрисуставной, внутрибронхиальной, интраабдоминальной, внутрикапсулярной, внутрихрящевой, внутриполостной, внутричревной, внутримозжечковой, интрацеребровентрикулярной доставки, доставки в толстую кишку, интрацервикальной, 35 внутрижелудочной, внутрипеченочной, интрамиокардиальной, внутрикостной, внутритазовой, внутриперикардиальной, интраперитонеальной, внутриплевральной доставки, доставки в предстательную железу, внутрилегочной, ректальной, внутрипочечной, интаретинальной, интраспинальной, внутрисуставной, внутригрудной, внутриматочной, внутрипузырной, болюсной, вагинальной, ректальной, буккальной, 40 подъязычной, интраназальной или чрескожной доставки.

[407] Условно активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, могут быть включены в медицинское устройство, причем 45 указанное устройство подходит для осуществления контакта или введения условно активных полипептидов или продуктов, впоследствии сконструированных из условно активных полипептидов, посредством по меньшей мере одного способа, выбранного из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, интраабдоминального, внутрисуставного, внутрихрящевого, внутриполостного, внутричревного, внутримозжечкового,

интрацеребровентрикулярного введения, введения в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутripеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, внутripерикардиального, интраперитонеального, внутripлеврального введения, введения в предстательную железу, внутрileгочного, ректального, внутripочечного, интаретинального, интраспинального, интрасиновиального, интраторакального, внутриматочного, интравезикального, болюсного, вагинального, ректального, буккального, сублингвального, интраназального или трансдермального введения.

[408] Согласно некоторым следующим вариантам реализации настоящего изобретения условно активные полипептиды или продукты, сконструированные из условно активных полипептидов, могут быть включены в набор в лиофилизированной форме в первом контейнере, необязательно, со вторым контейнером, содержащим стерильную воду, стерильную буферную воду или по меньшей мере один консервант, выбранный из группы, состоящей из фенола, м-крезола, *p*-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния, алкилпарабена, хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном разбавителе. Согласно одному аспекту в наборе концентрацию условно активных полипептидов или продуктов, сконструированных из условно активных полипептидов, в первом контейнере восстанавливают до концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 500 мг/мл при помощи содержимого второго контейнера. Согласно другому аспекту второй контейнер дополнительно содержит изотоническое средство. Согласно другому аспекту второй контейнер дополнительно содержит физиологически приемлемый буфер. Согласно одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ лечения по меньшей мере одного состояния, опосредованного родителем белком, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, состава, предложенного в наборе, и его предварительное восстановление до введения.

[409] Следующие примеры являются иллюстративными, но не ограничивающими настоящее описание. Другие подходящие модификации и адаптации множества условий и параметров, обычно встречающиеся в данной области, которые очевидны специалистам в данной области техники, включены в объем настоящего описания.

ПРИМЕРЫ

[410] Примеры 1-5 для получения условно активных полипептидов были описаны в патенте США №8,709,755 В2, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

[411] Пример 6. Эволюционирование легкой цепи или тяжелой цепи антитела.

[412] Эволюцию тяжелой цепи и легкой цепи антитела F1-10F10 осуществляли отдельно с применением СРЕ. Мутантов легкой цепи подвергали скринингу, чтобы обнаружить 26 мутантов легкой цепи с условной активностью, в данном случае указанные мутанты были более активными при рН 6,0, чем дикий тип, и мутанты были менее активными при рН 7,4, чем дикий тип. У 26 мутантов легкой цепи наблюдали мутации в 8 разных положениях в легкой цепи. 3 из 8 положений появились у более 5 из 26 мутантов легкой цепи. Данные 3 положения рассматривали в качестве горячих точек в легкой цепи.

Мутантов тяжелой цепи подвергали скринингу, чтобы обнаружить 28 мутантов тяжелой цепи с условной активностью. У 28 мутантов тяжелой цепи наблюдали мутации в 8 разных положениях в тяжелой цепи. 3 из 8 положений появились у более 5 из 28 мутантов тяжелой цепи. Данные 3 положения рассматривали в качестве горячих точек в тяжелой

цепи. Условную активность мутантов легкой цепи и мутантов тяжелой цепи подтверждали при помощи анализа ELISA.

[413] Наилучшее условно активное антитело, полученное в данном примере, характеризуется 17-кратным различием активности при pH 6,0 по сравнению с активностью при pH 7,4. Кроме того, многие условно активные антитела обладают активностью, которая была обратимой при величине pH между нормальным физиологическим pH 7,4 и абберрантным pH 6,0. Интересно отметить, что большинство условно активных антител, полученных в данном примере, проявляли оптимальную активность связывания при pH от приблизительно 5,5 до 6,5, когда активность условно активных антител исследовали в диапазоне pH от 5,0 до 7,4 при помощи анализа ELISA.

[414] Активность условно активных антител, полученных в данном примере, также подтверждали при помощи анализа FACS (fluorescence-activated cell sorting, сортировки флуоресцентно активированных клеток) с применением цельных клеток, в котором клетки CHO применяли для экспрессии антигена антител при pH 6,0 и pH 7,4. Условно активные антитела добавляли к клеткам CHO для измерения активности связывания. Анализ FACS подтвердил общую тенденцию результатов анализа ELISA для селективности условно активных антител при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4.

[415] Пример 7: Отбор условно активных антител в специальном буфере

[416] Мутантные антитела, полученные на этапе эволюции в соответствии с настоящим изобретением, подвергали анализу при нормальном физиологическом pH 7,4 и анализу при абберрантном pH 6,0. Оба анализа проводили с применением фосфатно-солевого буферного раствора (ФБР), содержащего бикарбонат, обнаруживаемый в сыворотке человека. Концентрация бикарбоната в растворе соответствовала концентрации бикарбоната в сыворотке человека, т.е. физиологической концентрации. Сравнительный анализ проводили с применением того же раствора ФБР без бикарбоната.

[417] Анализ для измерения связывающей активности мутантных антител или условно активных антител в данном примере представлял собой анализ ELISA, который проводили следующим образом:

1. За день до проведения анализа ELISA: лунки сенсibilизировали 100 мкл антигена для антитела Ab-A EDC с гистиридиновой меткой (2,08 мг/мл) при 1 мкг/мл ФБР,

3. Стряхивали буферный раствор из 96-луночного планшета, сенсibilизированного антигеном для антитела Ab-A-His, и насухо промакивали бумажными полотенцами.

4. Планшеты промывали 3 раза буфером N или ФБР,

5. Планшеты блокировали при помощи 200 мкл обозначенного буфера при комнатной температуре в течение 1 часа,

6. Отобранные мутанты CPE/CPS и белок дикого типа разбавляли до концентрации 75 нг/мл в обозначенных буферных растворах в соответствии с планом исследования. Значение pH буферного раствора устанавливали либо на 6,0, либо на 7,4 (в дальнейшем «обозначенный буферный раствор»),

6. Стряхивали буфер, и 100 мкл образца с концентрацией 75 нг/мл добавляли в каждую лунку в соответствии с разбивкой планшета,

7. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа,

8. Стряхивали буфер из 96-луночного планшета и насухо промакивали бумажными полотенцами,

9. Планшет промывали при помощи 200 мкл обозначенного буферного раствора в общей сложности 3 раза в соответствии с планом исследования,

10. Антитела против Flag с ПХ (пероксидазой хрена) получали в обозначенном

буферном растворе при разведении 1:5000, и 100 мкл антител против Flag с ПХ добавляли в каждую лунку в соответствии с планом исследования,

11. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа,

13. Планшет промывали 200 мкл обозначенного буферного раствора в общей сложности 3 раза,

14. Планшет обрабатывали 50 мкл 3,3',5,5-тетраметилбензидина (ТМВ) в течение 1,5 мин.

[418] Было обнаружено, что анализы в буферном растворе ФБР, содержащем бикарбонат, приводили к значимо большему показателю эффективности при отборе условно активных антител. Кроме того, условно активные антитела, отобранные с применением буферного раствора ФБР, содержащего бикарбонат, как правило, характеризовались гораздо более высоким отношением активности при pH 6,0 к активности при pH 7,4, тем самым обеспечивая в значительной степени более высокую селективность.

[419] Было также отмечено, что, когда отобранные условно активные антитела (с применением буферного раствора ФБР с бикарбонатом) исследовали в буферном растворе ФБР без бикарбоната, селективность условно активных антител при pH 6,0 относительно pH 7,0 была в значительной степени снижена. Однако когда бикарбонат добавляли к данному буферному раствору ФБР в физиологическом количестве, селективность тех же условно активных антител восстанавливалась.

[420] В другом анализе отобранные условно активные антитела исследовали в буферном растворе Кребса с добавлением бикарбоната. В данном буферном растворе Кребса с добавлением бикарбоната также наблюдали более высокое отношение активности при pH 6,0 к активности при pH 7,4. По всей видимости, это могло по меньшей мере отчасти быть обусловлено присутствием в буферном растворе Кребса бикарбоната.

[421] Когда концентрацию бикарбоната в буферном растворе ФБР снижали до концентраций ниже его физиологической концентрации, было обнаружено, что активность условно активного антитела при нормальном физиологическом pH 7,4 увеличивалась. Было обнаружено, что увеличение активности условно активного антитела при pH 7 связано со снижением концентрации бикарбоната в буферном растворе ФБР.

[422] Антитело дикого типа не подвергали воздействию различных количеств бикарбоната в буферном растворе ФБР при проведении исследования при pH 7,4, так как его активность остается неизменной при всех одинаковых концентрациях бикарбоната в буферном растворе ФБР, которые исследовали для условно активного антитела.

[423] Пример 8: Отбор условно активных антител в различных буферах

[424] Мутантные антитела, полученные на этапе эволюционирования согласно настоящему изобретению, подвергали анализу ELISA при нормальном физиологическом pH (7,4) и анализу ELISA при аберрантном pH (6,0). Оба анализа ELISA проводили с применением различных буферов, включая буферы на основе буфера Кребса с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и буферы на основе буфера ФБР с бикарбонатом и БСА.

[425] Анализ ELISA проводили следующим образом:

1. День, предшествующий ELISA: лунки сенсibilizировали 100 мкл антигена для антитела Ab-A ECD с гистиридиновой меткой (2,08 мг/мл) при 1 мкг/мл посадочного буфера (карбонат-бикарбонатный буфер).

2. Стряхивали буферный раствор из 96-луночного планшета, сенсibilизированного антигеном для антитела Ab-A-His, и насухо промакивали бумажными полотенцами.

3. Планшеты промывали 3 раза при помощи 200 мкл 20 буферов.

4. Планшеты блокировали при помощи 200 мкл 20 буферов при комнатной температуре в течение 1 часа.

5. Мутанты и химеры разбавляли до концентрации 75 нг/мл в 20 буферах в соответствии с планом исследования.

6. Стряхивали буфер, и 100 мкл разбавленного образца добавляли в каждую лунку в соответствии с разбивкой планшета.

7. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

8. Стряхивали буфер из 96-луночного планшета, и планшет насухо промакивали бумажными полотенцами.

9. Планшеты промывали при помощи 200 мкл 20 буферов в общей сложности 3 раза.

10. IgG против flag с ПХ получали в 20 буферах при разведении 1:5000. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора IgG против flag с ПХ.

11. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

12. Планшеты промывали при помощи 200 мкл 20 буферов в общей сложности 3 раза.

13. Планшеты обрабатывали 50 мкл 3,3',5,5-тетраметилбензидина в течение 30 секунд.

[426] Условно активные антитела, отобранные с применением анализов в буферном растворе ФБР с бикарбонатом, продемонстрировали гораздо более высокое отношение активности при pH 6,0 к активности при pH 7,4 по сравнению с антителами, которые отбирали с применением анализа в буферном растворе ФБР без бикарбоната. Кроме того, буферный раствор Кребса с добавлением бикарбоната также обеспечивал более высокое отношение активности при pH 6,0 к активности при pH 7,4 по сравнению с анализом в буферном растворе ФБР без бикарбоната. По всей видимости, бикарбонат важен для отбора желаемых условно активных антител.

[427] Пример 9: Отбор условно активных антител в различных буферах

[428] В данном примере был проведен скрининг условно активных антител, которые более активны при pH 6,0, чем антитело дикого типа, и менее активны при pH 7,4, чем антитело дикого типа, против антигена. Стадии скрининга проводили с применением буферов, приведенных ниже в таблицах 2 и 3. Указанные в таблице 2 буферы были основаны на буфере Кребса с добавлением дополнительных компонентов, представленных в столбце 1 таблицы 2.

Таблица 2. Буферы для анализа на основе буфера Кребса

Дополнительные компоненты	Буфер 1		Буфер 2		Буфер 3		Буфер 4		Буфер 5		Буфер 6		Буфер 7		Буфер 8 (Кребса)	
рН буферов	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4
D-Глюкоза	0	0	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Хлорид магния	0,0468	0,0468	0	0	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468	0,0468
Хлорид калия	0,34	0,34	0,34	0,34	0	0	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Хлорид натрия	7	7	7	7	7	7	0	0	7	7	7	7	7	7	7	7
Фосфат натрия двухосновный	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фосфат натрия одноосновный	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0	0	0,18	0,18	0,18	0,18
Бикарбонат натрия	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	1,26	0	0	1,26	1,26
Молочная кислота	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ
БСА	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[429] Некоторые буферы для анализов на основе буфера ФБР с дополнительными компонентами представлены ниже в таблице 3. Следует обратить внимание, что компоненты буферов в таблицах 2 и 3 представлены в виде количества в граммах, добавленных в один литр буфера. Однако концентрация в сыворотке человека составляет 10 масс. % от концентрации буфера.

Таблица 3. Буферы для анализов на основе буфера ФБР

Дополнительный компонент	Буфер 9 (ФБР, коммерческий)		Буфер 10 (ФБР+NaHCO ₃)	
рН буферов	рН 6,0	рН 7,4	рН 6,0	рН 7,4
KH ₂ PO ₄	0,144	0,144	0,144	0,144
NaCl	9	9	9	9
Na ₂ HPO ₄	0,795	0,795	0,795	0,795
Молочная кислота	16 мМ	1 мМ	16 мМ	1 мМ
Бикарбонат натрия	НД	НД	1,26	1,26
БСА	10	10	10	10

[430] Скрининг проводили с применением анализа ELISA с данными буферами для анализа. Анализ ELISA проводили так, как описано в примерах 7-8. Отобранные условно активные антитела для каждого из 10 буферов для анализа представлены в таблице 4 ниже. Величина ОП (оптической плотности) при 450 нм обратно коррелирует с активностью связывания в анализе ELISA.

Таблица 4. Отобранные условно активные антитела (мутанты) с применением разных буферов для анализа

		Отобранные мутанты	Дикий тип
Буфер 1	pH 6,0	0,859	1,6414
	pH 7,4	0,0883	1,2474
Буфер 2	pH 6,0	0,6599	1,1708
	pH 7,4	0,0717	1,1839
Буфер 3	pH 6,0	0,4806	0,7765
	pH 7,4	0,0723	1,3497
Буфер 4	pH 6,0	1,7364	1,7777
	pH 7,4	0,4457	1,6173
Буфер 5	pH 6,0	0,6776	1,6905
	pH 7,4	0,0747	1,3987
Буфер 6	pH 6,0	0,7244	1,4123
	pH 7,4	0,0731	1,3439
Буфер 7	pH 6,0	0,6212	1,348
	pH 7,4	0,8044	1,7381
Буфер 8	pH 6,0	0,7977	1,3893
	pH 7,4	0,1042	1,5535
Буфер 9	pH 6,0	0,468	1,5087
	pH 7,4	0,4455	1,347
Буфер 10	pH 6,0	0,5626	1,3439
	pH 7,4	0,0727	1,2547

[431] Селективность некоторых отобранных условно активных антител подтверждали с применением буферов 8 и 9, и было обнаружено, что данные антитела обладают желаемой селективностью при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4, как представлено на фигуре 1. Следует отметить, что применение различных буферов влияет на селективность условно активных антител.

[432] Пример 10: Активность условно активных антител в различных буферах

[433] Активность условно активных антител, эволюционированных из двух моноклональных антител (МАТ 048-01 и МАТ 048-02 в качестве родительских антител), соответственно, измеряли в двух различных буферах (ФИГ. 2). Два буфера представляли собой фосфатный буфер (условие IV) и буфер Кребса (условие I). Шесть условно активных антител эволюционировали из МАТ 048-01: САВ Hit 048-01, САВ Hit 048-02, САВ Hit 048-03, САВ Hit 048-04, САВ Hit 048-05 и САВ Hit 048-06. Три условно активных антитела эволюционировали из МАТ 048-02: САВ Hit 048-07, САВ Hit 048-08 и САВ Hit 048-09.

[434] В данном исследовании было продемонстрировано, что на селективность (отношение активности в анализе при pH 6,0 к активности в анализе при pH 7,4) условно активных антител влиял буфер, который применяли в анализе. Условно активные антитела, эволюционировавшие из МАТ 048-02 дикого типа, продемонстрировали в значительной степени более высокую селективность в буфере Кребса, чем в фосфатном буфере (ФИГ. 2).

[435] Пример 11: Селективность условно активных антител и бикарбонат

[436] В примере 10 более высокая селективность условно активных антител наблюдалась в буфере Кребса (условие I) по сравнению с фосфатным буфером (условие IV). На основании этого проводили идентификацию компонента буфера Кребса, который вносил наиболее значимый вклад в более высокую селективность, наблюдавшуюся в

5 примере 10. Селективность одного условно активного антитела повторно исследовали в буферах, полученных из буферов Кребса, при исключении из него различных компонентов по одному (ФИГ. 3, левая группа столбцов). Когда использовали полный буфер Кребса, селективность условно активного антитела являлась высокой с отношением активности при pH 6,0/7,4, составляющим приблизительно 8. Когда

10 компоненты A-F по одному исключали из буфера Кребса, селективность условно активного антитела не была утрачена, хотя условно активное антитело и стало менее селективным, когда исключали каждый из компонентов C и D. Однако когда из буфера Кребса исключали компонент G (бикарбонат), селективность условно активного антитела была практически утрачена. См. ФИГ. 3. Это свидетельствует, что бикарбонат

15 по меньшей мере частично отвечает за высокую селективность условно активных антител в буфере Кребса.

[437] Затем селективность того же условно активного антитела измеряли в фосфатном буфере (условие IV), который не содержал бикарбоната; было установлено, что селективность условно активного антитела в фосфатном буфере была полностью

20 утрачена. Когда в фосфатный буфер добавляли бикарбонат, селективность условно активного антитела восстанавливалась до уровня, наблюдавшегося в буфере Кребса. Это подтверждает, что бикарбонат был необходим для селективности данного условно активного антитела.

[438] Пример 12: Бикарбонат подавляет связывание при pH 7,4

[439] В данном примере измеряли активность связывания трех условно активных антител (CAB Hit A, CAB Hit B и CAB Hit C) при pH 7,4 в буферах, содержащих различные концентрации бикарбоната, которые варьировали от 0 до физиологической концентрации бикарбоната (приблизительно 20 мМ, ФИГ. 4). Было установлено, что активность связывания всех трех условно активных антител при pH 7,4 снижалась дозозависимым

30 образом с повышением концентрации бикарбоната от 0 до физиологической концентрации (ФИГ. 4). С другой стороны, бикарбонат не влиял на активность связывания антитела дикого типа. В данном исследовании было продемонстрировано, что селективность условно активных антител в присутствии бикарбоната, вероятно, по меньшей мере отчасти была обусловлена утратой активности связывания условно

35 активных антител при pH 7,4 в результате взаимодействия с бикарбонатом.

[440] Пример 13: Активность условно активных антител против ROR2 в различных буферах

[441] Условно активные антитела против ROR2, которые были отобраны с применением растворов для анализа, содержащих бикарбонат натрия (как описано в

40 примере 9), исследовали в различных буферах: CAB-P представлял собой стандартный фосфатно-солевой буферный раствор (буфер ФБР), который использовали при pH 6,0 или 7,4; CAB-PSB представлял собой буфер ФБР с добавлением 15 мМ натрия бикарбоната при pH 6,0 или 7,4; и CAB-PSS представлял собой буфер ФБР с добавлением 10 мМ натрия сульфида нонагидрата при pH 6,0 или 7,4.

[442] Активность данных условно активных антител измеряли согласно следующему протоколу ELISA:

1. За день до проведения анализа ELISA: планшет сенсibilizировали 100 мкл 1 мкг/мл антигена в течение ночи в ФБР при 4°C.

2. Планшеты дважды промывали 200 мкл буфера CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS согласно разбивке планшетов.

3. Планшеты блокировали 200 мкл буфера CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS согласно разбивке планшетов при комнатной температуре в течение 1 часа.

5 4. Разводили образец антитела и положительный контроль в буфере CAB-P, CAB-PSB, или CAB-PSS, как указано в разбивке планшетов.

5. Стряхивали блокирующий буфер из 96-луночного планшета, насухо промакивали бумажными полотенцами.

10 6. В каждую лунку согласно разбивке планшетов добавляли 100 мкл разведенных образцов антитела, положительный контроль или отрицательный контроль.

6. Инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 1 часа.

7. Готовили вторичное антитело в буфере CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS согласно разбивке планшетов.

15 8. Стряхивали блокирующий буфер из 96-луночного планшета, насухо промакивали бумажными полотенцами.

9. Промывали планшеты всего 3 раза по 200 мкл буфера CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS согласно разбивке планшетов.

10. В каждую лунку согласно разбивке планшетов добавляли разведенное вторичное антитело в буфере CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS.

20 11. Инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 1 часа.

12. Стряхивали буфер из 96-луночного планшета, насухо промакивали бумажными полотенцами.

13. Промывали планшеты всего 3 раза буфером CAB-P, CAB-PSB или CAB-PSS.

14. Доводили субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) до комнатной температуры.

25 15. Стряхивали буферы из планшета, насухо промакивали бумажными полотенцами.

16. Добавляли 50 мкл субстрата TMB.

17. Останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1н HCl. Время развития реакции составляло 3 мин.

30 18. Считывали поглощение при ОП 450 нм с применением считывающего устройства для планшетов.

[443] Активность данных условно активных антител против ROR2 представлена на фигуре 7. Условно активные антитела продемонстрировали более высокую активность в буфере CAB-PSB при pH 6,0, чем при pH 7,4, т.е. селективность при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4. Данная селективность для нескольких условно активных антител
35 была утрачена или в значительной степени снижена в буферах CAB-P. Однако данная селективность также наблюдалась в буферах CAB-PSS при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4. Напротив, антитело дикого типа продемонстрировало относительно незначительную селективность или отсутствие селективности в любом из буферов.

40 [444] Данный пример демонстрирует, что бисульфид выполняет аналогичную функцию, как и бикарбонат, для опосредования условного связывания для исследованных условно активных антител против ROR2.

[445] Пример 14: Активность условно активных антител против Axl в различных буферах

45 [446] Условно активные антитела против Axl, которые отбирали с применением растворов для анализа, содержащих бикарбонат натрия (как описано в примере 9), исследовали в различных буферах: CAB-P, CAB-PSB и CAB-PSS, как описано в примере 13. Активности данных условно активных антител против Axl, которые измеряли с применением того же протокола ELISA, описанного в примере 13, представлены на

фигуре 8. Условно активные антитела продемонстрировали более высокую активность в буфере САВ-PSB при pH 6,0, чем при pH 7,4, т.е. селективность при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4. Данная селективность для данных условно активных антител была утрачена или в значительной степени снижена в буферах САВ-Р. Селективность также
 5 наблюдалась в буферах САВ-PSS при pH 6,0 по сравнению с pH 7,4. Напротив, антитело дикого типа продемонстрировало по существу отсутствие селективности в любом из буферов.

[447] Данный пример также демонстрирует, что бисульфид выполняет аналогичную функцию, как и бикарбонат, для опосредования условного связывания для
 10 исследованных условно активных антител против Axl.

[448] Пример 15: Получение условно активные антител против Axl в растворах для анализа с бисульфид-ионом

[449] Растворы для анализа, использованные в данном примере, готовили следующим образом:

15 Буфер САВ-PSB, pH 6,0 (с 1% БСА)

1. В ФБР-Cellgro добавляли 1,26 г/л натрия бикарбоната, что составляет конечную концентрацию 15 mM (Sigma S5761)

2. Добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре) (MP, кат. №0218054991)

20 3. Доводили pH до 6,0 с применением 1N HCl при перемешивании

4. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали pH перед применением. При необходимости корректировали pH с помощью 1N HCl

Буфер САВ-PSB, pH 7,4 (с 1% БСА)

1. К ФБР-Cellgro добавляли 1,26 г/л натрия бикарбоната, что составляет конечную
 25 концентрацию 15 mM (Sigma S5761)

2. Добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре) (MP, кат. №0218054991)

3. Доводили pH до 7,4 с применением 1N HCl при перемешивании

4. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали pH перед применением.

30 При необходимости корректировали pH с помощью 1N HCl

Буфер САВ-PSS, pH 6,0 (с 1% БСА) с 10 mM бисульфида

1. К ФБР-Cellgro добавляли 2,4 г/л натрия сульфида нонагидрата (Na₂S·9H₂O), что составляет конечную концентрацию 10 mM (ACROS, №424425000)

2. Добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре) (MP, кат. №0218054991)

3. Доводили pH до 6,0 с применением 1N HCl при перемешивании

4. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали pH перед применением. При необходимости корректировали pH с помощью 1N HCl

Буфер САВ-PSS, pH 7,4 (с 1% БСА) с 10 mM бисульфида

40 1. К ФБР-Cellgro добавляли 2,4 г/л натрия сульфида нонагидрата (Na₂S·9H₂O), что составляет конечную концентрацию 10 mM (ACROS, №424425000)

2. Добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре) (MP, кат. №0218054991)

3. Доводили pH до 7,4 с применением 1N HCl при перемешивании

4. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали pH перед применением. При необходимости корректировали pH с помощью 1N HCl

Буфер САВ-PSS, pH 6,0 (с 1% БСА) с 1 mM бисульфида

1. Готовили 1/10 кратное разведение буфера BioAtla САВ-PSS, pH 6,0 (с 1% БСА)

10М, что составляет конечную концентрацию 1 мМ

2. Доводили рН до 6,0 с применением 1н HCl при перемешивании

3. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали рН перед применением.

При необходимости корректировали рН с помощью 1н HCl

5 Буфер САВ-PSS, рН 7,4 (с 1% БСА) с 1 мМ бисульфида

1. Готовили 1/10 кратное разведение буфера BioAtla САВ-PSS, рН 7,4 (с 1% БСА)

10М, что составляет конечную концентрацию 1 мМ

2. Доводили рН до 7,4 с применением 1н HCl при перемешивании

3. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали рН перед применением.

10 При необходимости корректировали рН с помощью 1н HCl

Буфер САВ-P, рН 6,0 (с 1% БСА)

1. В ФБР-Cellgro добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре)

2. Доводили рН до 6,0 с применением 1н HCl при перемешивании

3. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали рН перед применением.

15 При необходимости корректировали рН с помощью 1н HCl

Буфер САВ-P, рН 7,4 (с 1% БСА)

1. В ФБР-Cellgro добавляли БСА до конечной концентрации 1% (в одном литре)

2. Доводили рН до 7,4 с применением 1н HCl при перемешивании

3. Хранили при температуре 4°C. Повторно контролировали рН перед применением.

20 При необходимости корректировали рН с помощью 1н HCl

[450] Способ согласно настоящему изобретению осуществляли в отношении антитела дикого типа против Axl для получения мутантных антител с применением аналогичного протокола, как описано в предшествующих примерах. Мутантные антитела анализировали с применением растворов для анализа, содержащих 10 мМ бисульфид-иона, при рН 6,0 или рН 7,4 для отбора условно активных антител. Условно активные антитела (ВАР063.1-САВ1-8), которые были отобраны, представлены на ФИГ. 9.

[451] Отобранные условно активные антитела характеризовались более высокой активностью связывания с Axl при рН 6,0, чем при рН 7,4, при исследовании в анализе с концентрацией 10 мМ бисульфида. Однако в растворах для анализа с концентрацией всего 1 мМ бисульфида разница активности между рН 6,0 и рН 7,4 значительно снижалась для всех отобранных условно активных антител, за исключением одного. См. ФИГ. 9.

[452] Следует отметить, что в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. Кроме того, упоминание объекта в единственном числе, термины «один или несколько» объектов и «по меньшей мере один» объект в настоящем документе можно применять взаимозаменяемо. Термины «содержащий», «включающий», «обладающий» и «сконструированный из» можно также применять взаимозаменяемо.

[453] Если не указано обратное, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как молекулярная масса, процент, отношение, условия реакции и т.д., применяемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях при помощи термина «приблизительно», независимо от того, присутствует ли термин «приблизительно» или нет. Соответствующим образом, если не указано обратное, численные параметры, указанные в описании и формуле изобретения, являются приблизительными, которые могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые следует получить в соответствии с настоящим описанием. В крайнем случае, а не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов

объема формулы изобретения, каждый численный параметр следует по меньшей мере истолковывать в свете количества приведенных значащих цифр и путем применения обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, предложенные в широкой области настоящего изобретения, являются приближениями, 5 числовые значения, приведенные в конкретных примерах, описаны настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей сути содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, обнаруженного в их соответствующих опытных измерениях.

[454] Следует понимать, что каждый компонент, соединение, заместитель или 10 параметр, раскрытый в настоящем документе, следует истолковывать как раскрытый для применения по отдельности или в комбинации с одним или несколькими из всех без исключения других компонентов, соединений, заместителей или параметров, раскрытых в настоящем документе.

[455] Также следует понимать, что каждое количество/значение или диапазон 15 количеств/значений для каждого компонента, соединения, заместителя или параметра, раскрытого в настоящем документе, следует интерпретировать как также раскрытое в комбинации с каждым количеством/значением или диапазоном количеств/значений, раскрытых для любого другого компонента или компонентов, соединения или соединений, заместителя или заместителей либо параметра или параметров, раскрытых 20 в настоящем документе, и что любая комбинация количеств/значений или диапазонов количеств/значений для двух или более компонента или компонентов, соединения или соединений, заместителя или заместителей либо параметров, раскрытых в настоящем документе, таким образом, также раскрыты в комбинации друг с другом для целей данного описания.

[456] Кроме того, понятно, что каждый раскрытый в настоящем документе диапазон 25 следует интерпретировать как раскрытие каждого конкретного значения в пределах раскрытого диапазона, который имеет такое же количество значащих цифр. Таким образом, диапазон 1-4 следует интерпретировать как сокращенное раскрытие значений 1, 2, 3 и 4. Кроме того, следует понимать, что каждый нижний предел каждого 30 раскрытого в настоящем документе диапазона следует интерпретировать как раскрытый в комбинации с каждым верхним пределом каждого диапазона и каждым конкретным значением в каждом раскрытом в настоящем документе диапазоне для одного и того же компонента, соединений, заместителя или параметра. Таким образом, данное раскрытие следует интерпретировать как раскрытие всех диапазонов, полученных 35 путем комбинирования каждого нижнего предела каждого диапазона с каждым верхним пределом каждого диапазона или с каждым конкретным значением в каждом диапазоне или путем комбинирования каждого верхнего предела каждого диапазона с каждым конкретным значением в каждом диапазоне.

[457] Более того, конкретные количества/значения компонента, соединения, 40 заместителя или параметра, раскрытого в настоящем описании или примере, следует интерпретировать как раскрытие либо нижнего, либо верхнего предела диапазона и, следовательно, его можно комбинировать с любым другим нижним или верхним пределом диапазона или конкретным количеством/значением для того же самого компонента, соединения, заместителя или параметра, раскрытого в другом разделе 45 указанной заявки, для формирования диапазона для такого компонента, соединения, заместителя или параметра.

[458] Содержание всех документов, упомянутых в настоящем документе, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки или, в качестве альтернативы, для

обеспечения раскрытия, на которое они специальным образом ссылаются. Заявитель или заявители не намерены оглашать любые раскрытые варианты публике и в той мере, в какой любые раскрытые модификации или изменения не могут буквально подпадать в объем формулы изобретения, их рассматривают как часть настоящего документа в соответствии с доктриной эквивалентов.

[459] Следует понимать, однако, что, несмотря на то, что многочисленные характеристики и преимущества настоящего изобретения указаны в предшествующем описании, совместно с деталями структуры и функцией настоящего изобретения, настоящее описание носит исключительно иллюстративный характер, и можно в полной мере сделать подробные изменения, особенно в вопросах формы, размера и расположения частей в рамках принципов настоящего изобретения, обозначенных широкими общими значениями терминов, в которых выражены прилагаемые формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения из родительского антитела или фрагмента антитела, связывающегося с антигеном, антитела или фрагмента антитела, обладающего зависящей от условий активностью связывания с антигеном, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит по меньшей мере три CDR родительского антитела, обеспечивающие способность распознавать и связывать антиген, а также содержащие мутацию относительно родительского антитела, причем указанная активность связывания измерена в анализах, проведенных при первом и втором значениях указанного условия, причем указанная зависящая от условий активность связывания зависит и от первого, и от второго значений условия, при которых измеряют активность, а также зависит от концентрации соединения или иона, имеющего молекулярную массу менее 100 а.е.м., выбранного из бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфата, сульфида водорода, аммония, сульфида натрия и любой их комбинации, причем указанный способ включает следующие этапы:

(i) эволюционирование родительского антитела или фрагмента антитела посредством мутирования по меньшей мере одной аминокислоты с получением одного или нескольких мутантных антител или фрагментов антител;

(ii) проведение с указанными одним или несколькими мутантными антителами или фрагментами антител первого анализа связывания указанных одного или более антител или фрагментов антител с антигеном при первом значении условия в присутствии указанного соединения или иона, второго анализа при концентрации на уровне физиологической или близкой к физиологической концентрации этого соединения или иона в организме субъекта на связывание указанных одного или нескольких антител или фрагментов антитела при втором значении условия в присутствии того же соединения или иона при концентрации, на уровне физиологической или близкой к физиологической концентрации этого соединения или иона в организме субъекта, третьего анализа связывания указанных одного или нескольких мутантных антител или фрагментов антител при первом значении условия в отсутствие указанного соединения или иона и четвертого анализа связывания указанных одного или нескольких мутантных антител или фрагментов антител при втором значении условия в отсутствие соединения или иона;

(iii) получение одного или нескольких условно активных антител или фрагментов антител посредством отбора мутантных антител или фрагментов антител, которые характеризуются отношением связывания с антигеном в первом анализе к активности

связывания с антигеном во втором анализе по меньшей мере 3,0 и отношением связывания с антигеном в третьем анализе к связыванию с антигеном в четвертом анализе менее 3,0 .

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное отношение связывания с антигеном в первом анализе к связыванию с антигеном во втором анализе составляет по меньшей мере 4,0, по меньшей мере 6,0 или по меньшей мере 8,0.

3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное соединение или ион выбран из бикарбоната, бисульфата, сульфида водорода, сульфида натрия и любой их комбинации.

4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное условие представляет собой рН и указанное соединение или ион имеет рКа, которая отличается на до 0,5, 1, 2, 3 или 4 единиц рН от первого значения условия.

5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное условие представляет собой рН и указанное соединение или ион имеет рКа между первым значением условия и вторым значением условия.

6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что условие представляет собой рН и указанное соединение или ион имеет рКа более 6,2.

7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное условие представляет собой рН и указанное соединение или ион имеет рКа менее 7,2–7,4.

8. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное условие представляет собой рН и указанное соединение или ион имеет рКа более 6,2 и менее 7,2–7,4.

9. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное первое значение условия представляет собой рН в диапазоне 5,5–7,2 или в диапазоне 6,2–6,8 и указанное второе значение условия представляет собой рН в диапазоне 7,2–7,6.

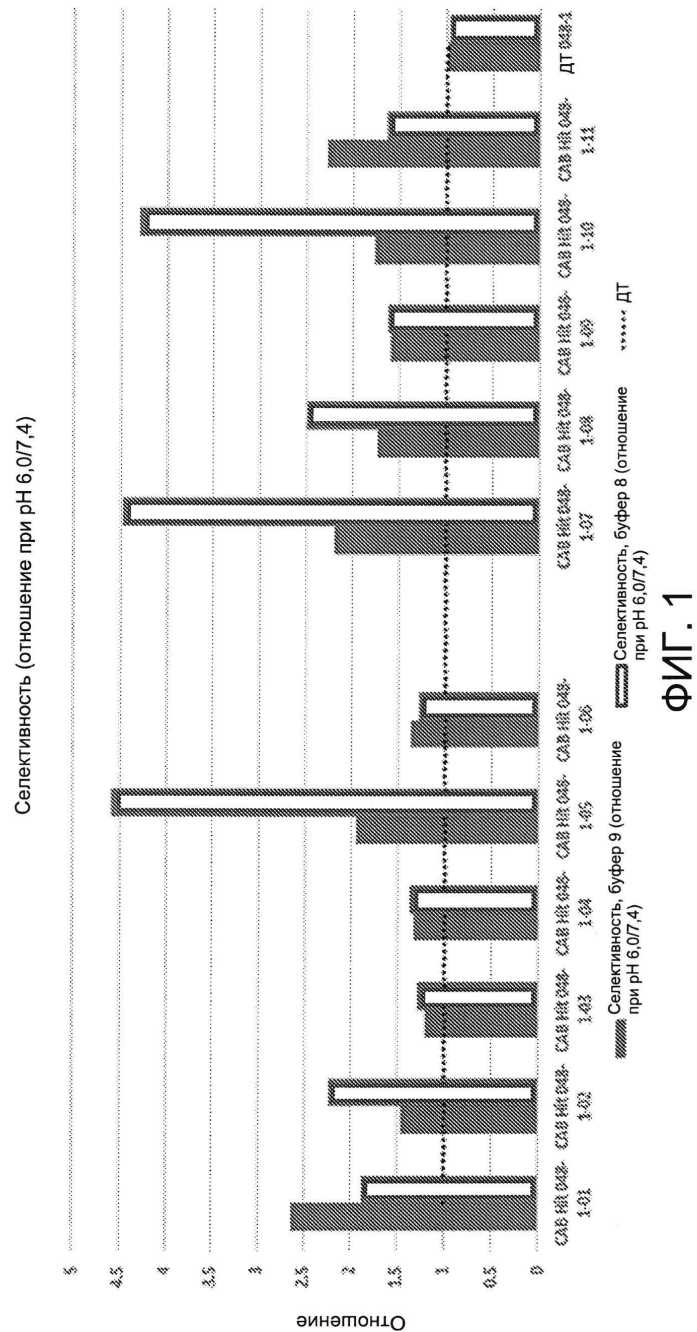
10. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное соединение или ион выбраны из бикарбоната, ацетата, лактата, бисульфата, сульфида водорода, аммония, сульфида натрия и любых их комбинаций, когда присутствует в растворе для анализа, присутствует в концентрации от 100 мкМ до 100 мМ.

11. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное антитело или фрагмент антитела представляет собой неприродное мутантное антитело или фрагмент антитела.

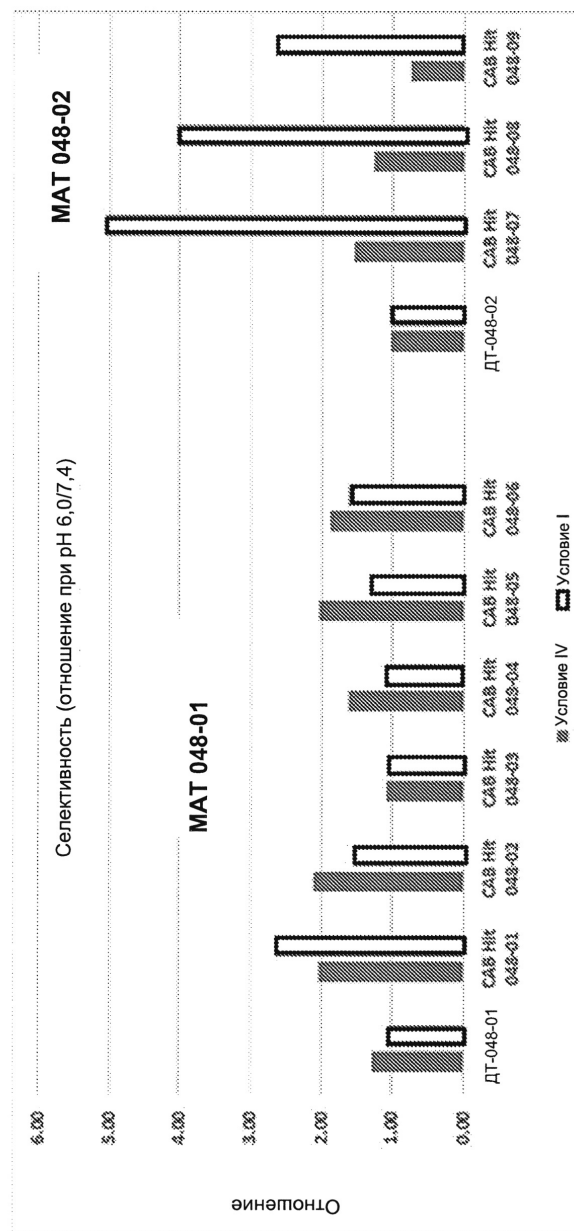
12. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанное мутантное антитело или фрагмент антитела мутирован таким образом, что он имеет более высокую долю заряженных остатков аминокислот, чем доля заряженных остатков аминокислот в родительском антителе или фрагменте антитела.

1

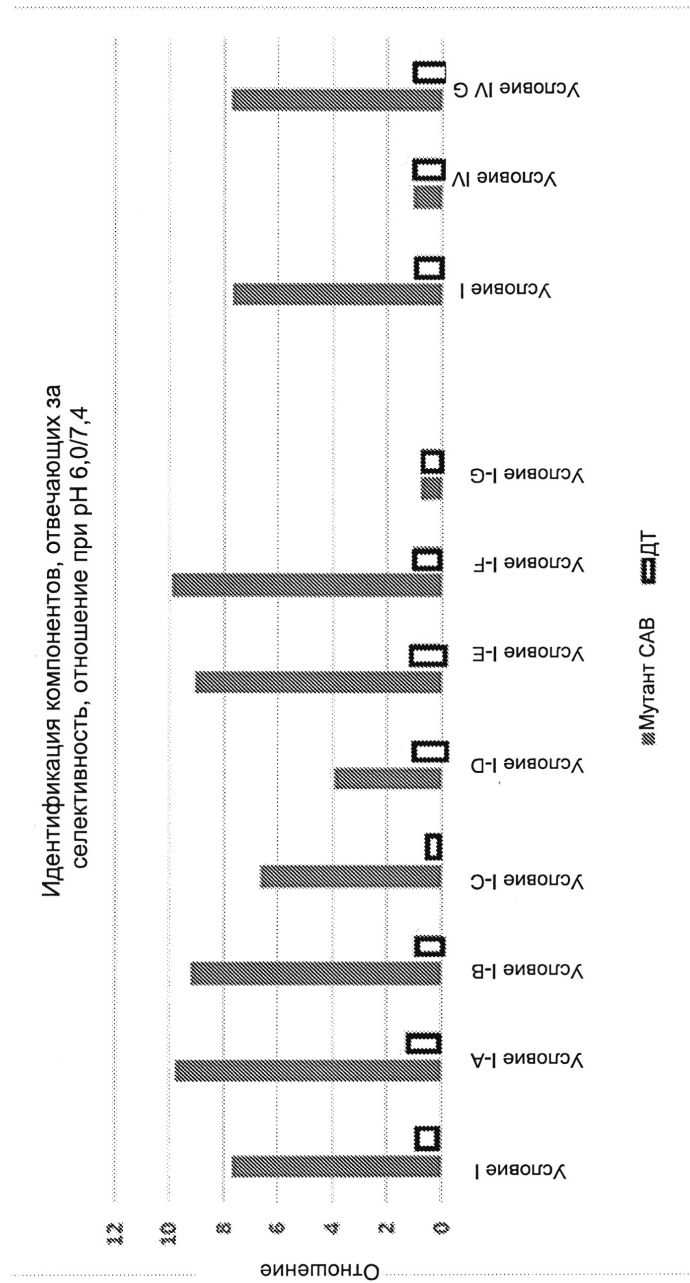
1 / 9



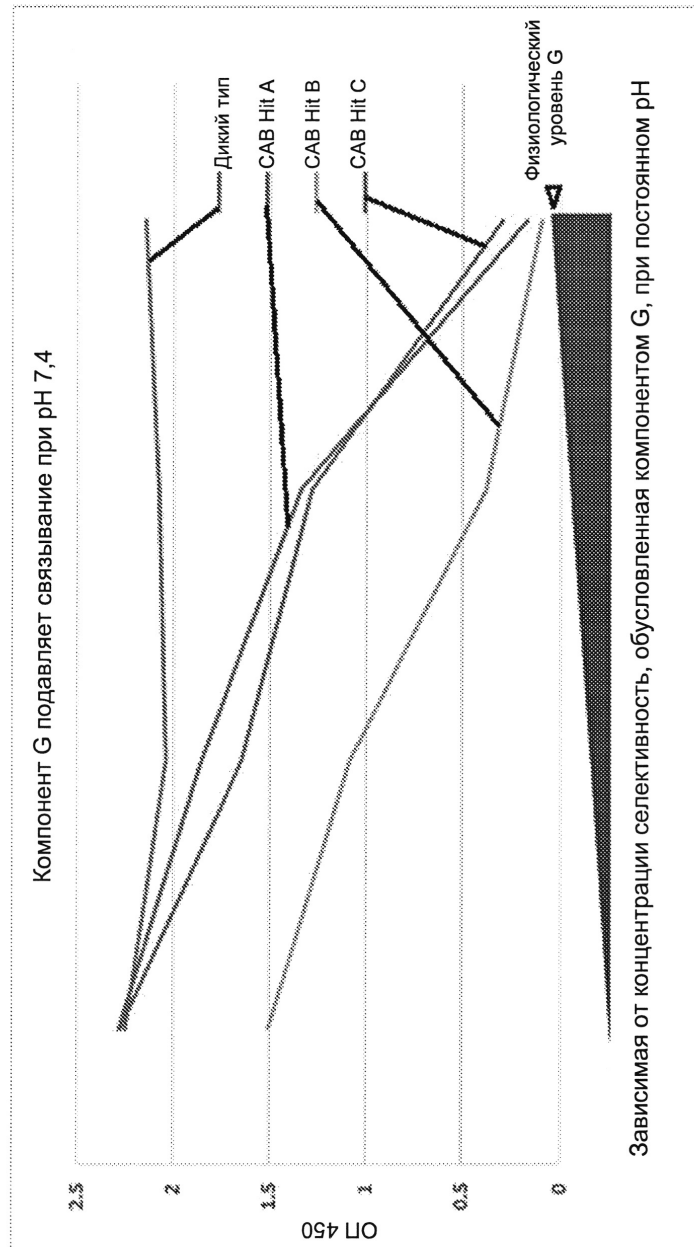
2



ФИГ. 2

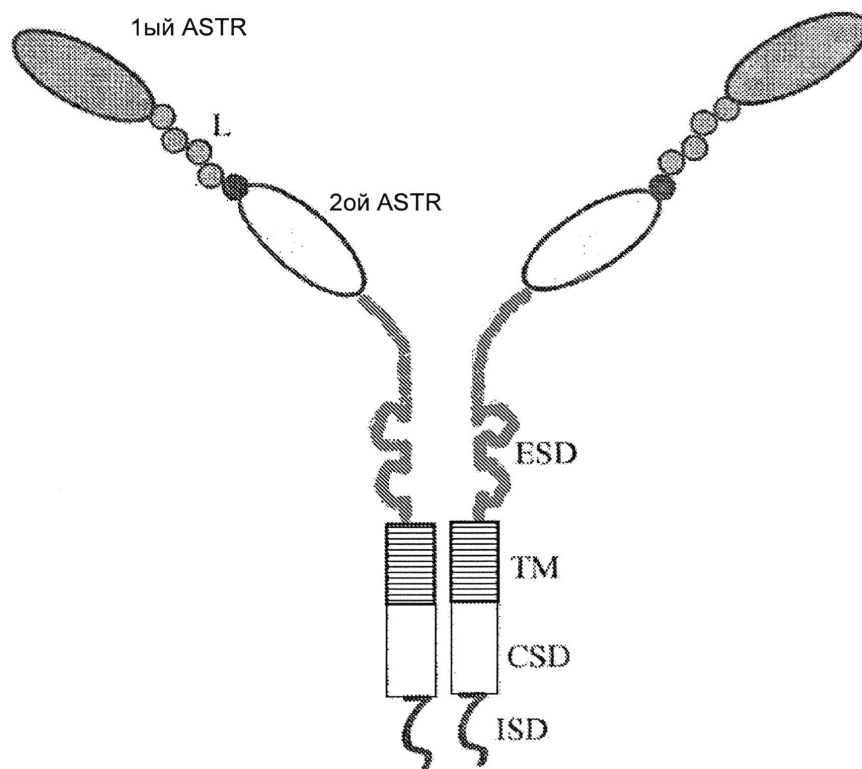


ФИГ. 3



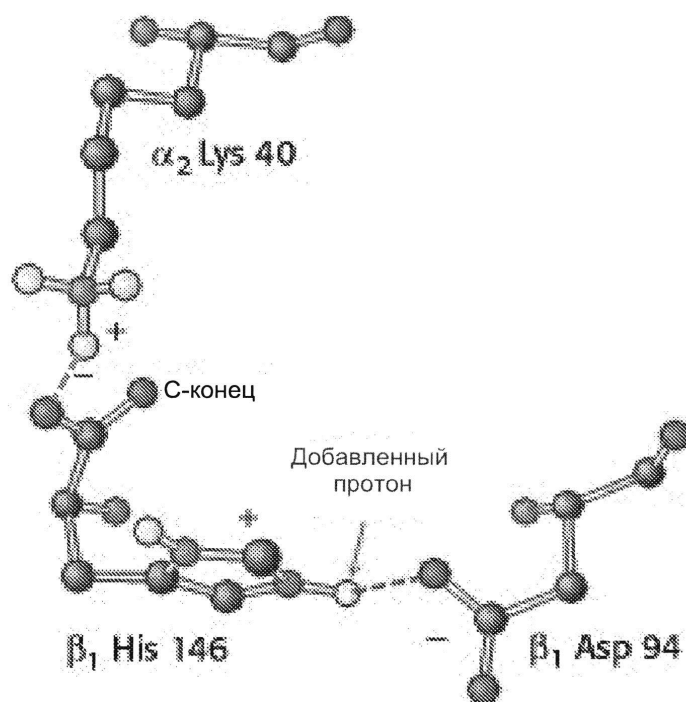
ФИГ. 4

5 / 9



ФИГ. 5

6 / 9



ФИГ. 6

