

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034356**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(21) Номер заявки
201591165

(22) Дата подачи заявки
2013.12.16

(51) Int. Cl. **C07K 14/65** (2006.01)

**(54) ВАРИАНТНЫЙ БЕЛОК IGF-1 ЧЕЛОВЕКА И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО КОМПОЗИЦИЯ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОГО РАССТРОЙСТВА**

(31) 61/738,475

(32) 2012.12.18

(33) US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/IB2013/060985

(87) WO 2014/097116 2014.06.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Форнаро Мара, Хубер Томас, Цурини
Мауро (CH)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-0040612

WO-A1-2011011073

WO-A2-2006074390

WO-A2-2007146689

DATABASE UniProt [Online] 21 July
1986 (1986-07-21), "RecName: Full =
Insulin-like growth factor II; Short=IGF-II;
AltName: Full=Somatomedin-A; Contains: RecName:
Full=Insulin-like growth factor II; Contains:",
XP002724513, retrieved from EBI accession no.
UNIPROT:P01344, Database accession no. P01344,
the whole document

(57) Изобретение относится к варианту человеческого белка IGF-1, в котором аминокислота глицин в положении 42 относительно последовательности SEQ ID NO:1 человеческого белка IGF-1 удалена или заменена на серин, а также к фармацевтической композиции для лечения мышечного расстройства у пациента, содержащей указанный вариант человеческого белка IGF-1.

B1

034356

034356

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области модификаций инсулиноподобных факторов роста 1 (IGF-1). В частности, изобретение относится к модифицированным полипептидам IGF-1, которые связаны с Fc-участком иммуноглобулина человека.

Уровень техники

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) являются частью сложной системы, которую клетки используют для взаимодействия со своим физиологическим окружением. Указанная сложная система (часто обозначаемая, как ось инсулиноподобного фактора роста) состоит из двух клеточных поверхностных рецепторов (IGF-1R и IGF-2R), двух лигандов (IGF-1 и IGF-2), семейства шести высокоаффинных IGF-связывающих белков (IGFBP 1-6) и ассоциированных с IGFBP деградирующих ферментов (протеаз). Указанная система имеет значение не только для регуляции нормальных физиологических процессов, но также для ряда патологических состояний (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003).

Показано, что ось IGF играет роль в активации клеточной пролиферации и торможении клеточной гибели (апоптозе). IGF-1 преимущественно секретируется печенью в результате стимуляции гормоном роста человека (hGH). Почти каждая клетка в организме человека находится под влиянием IGF-1, особенно клетки мышц, хрящей, костей, печени, почек, нервов, кожи и легких. Наряду с инсулиноподобными эффектами IGF-1 также может регулировать рост клеток. IGF-1 и IGF-2 регулируются семейством продуктов генов, известных как IGF-связывающие белки. Указанные белки помогают модулировать действие IGF в сложных путях, которые вовлекают как ингибирование действия IGF путем предотвращения его связывания с рецепторами IGF, так и усиление действия IGF путем способствования доставки к рецепторам и увеличения времени полужизни IGF в кровотоке. Существует по меньшей мере шесть охарактеризованных связывающих белков (IGFBP1-6).

Зрелая форма IGF-1 человека, также называемая соматомедином, представляет собой небольшой белок, состоящий из 70 аминокислот, который, как было показано, стимулирует рост различных клеток в культуре. Белок IGF-1 исходно кодируется тремя известными сплайс-вариантами мРНК. Открытая рамка считывания каждой мРНК кодирует белок-предшественник, содержащий IGF-1, состоящий из 70 аминокислот (SEQ ID NO:1), и определенный Е-пептид на С-конце, в зависимости от определенной мРНК IGF-1. Указанные Е-пептиды называются пептидами Ea (rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO:2), Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgwpgkthpggeqkegteaslqirgkqkqkeqrreigsrnaecrgkkgk; SEQ ID NO:3) и Ec (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnknktsqrrkgstfeerk; SEQ ID NO:4) и составляют в длину от 35 до 87 аминокислот и содержат участок общей последовательности на N-конце и участок вариабельной последовательности на С-конце. Например, открытая рамка считывания белка дикого типа IGF-1-Ea кодирует полипептид из 135 аминокислот, включающий лидерную последовательность, и полипептид из 105 аминокислот без лидерной последовательности (gpetylgaelvdaqlqfvcgdrqfyfnkptgygssrrapqtgvideccfrscdlrrlemysa plkpaksarsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; SEQ ID NO:5). При физиологической экспрессии Е-пептиды отщепляются от предшественника эндогенными протеазами с образованием зрелого IGF-1, состоящего из 70 аминокислот. Доступность и время полужизни IGF-1 в сыворотке человека, главным образом, зависят и модулируются протеазами и белками, связывающими IGF-1 (IGFBP). IGFBP могут либо ингибировать, либо потенцировать действия IGF-1 (Oh Y., et al., Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-1/insulin hybrid, and IGF-I analogs. Endocrinology, 1993 Mar; 132(3):1337-44). Стратегии увеличения времени полужизни IGF-1 описаны в предшествующем уровне техники. Стратегии, которые были предложены, включают:

- (i) получение вариантов IGF-1, содержащих специфические мутации, направленные на предотвращение расщепления IGF-1 в сыворотке человека сериновыми протеазами или на ослабление негативного влияния белков, связывающих IGF-1, на доступность или время полужизни в сыворотке IGF-1 (WO200040613, WO05033134, WO2006074390, WO2007/146689);
- (ii) получение слитого белка IGF-1, где зрелый белок IGF-1 соединяют с Fc-участком иммуноглобулина человека (WO2005033134, WO200040613);
- (iii) использование белков-предшественников IGF-1, где отщепление Е-пептида от IGF-1 протеазой снижается путем модификации белка-предшественника (WO2007146689);
- (iv) комбинации вышеописанных стратегий ((i)/(ii) WO05033134, (i)/(ii) WO200040613, (i)/(iii) WO2007146689).

Несмотря на описанные выше стратегии, варианты предшественника IGF-1, слитого с Fc-участком иммуноглобулина человека, остаются неудовлетворительными лекарствами-кандидатами в основном по двум причинам: (i) низкая продуктивность производственной системы млекопитающих и (ii) повышенная аффинность связывания с инсулиновым рецептором (InsR) по сравнению с неизмененным IGF-1 человека дикого типа, которая может привести к гипогликемии, нежелательному явлению, вызывающему терапевтическую озабоченность.

Следовательно, существует потребность в технологии, которая позволяет преодолеть описанные выше проблемы предшествующего уровня техники. Настоящее изобретение соответствует указанной потребности в ряде аспектов.

Сущность изобретения

Первый объект изобретения относится к варианту человеческого белка IGF-1 (hIGF-1), в котором аминокислота глицин в положении 42 указанного белка hIGF-1 удалена или заменена на серин и в котором нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO:1.

В определенном варианте осуществления изобретение относится к варианту человеческого белка, в котором аминокислота глицин в положении 42 удалена или заменена на серин.

В дополнительном варианте осуществления упомянутый выше белок человека IGF-1 содержит дополнительные делеции или мутации аминокислот G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69 и/или A70.

В дополнительном варианте осуществления упомянутый выше белок-предшественник человека IGF-1 содержит Еа-пептид и дополнительные делеции или мутации аминокислот G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 и/или M105.

Вариант человеческого белка IGF-1, как описано выше, в котором белок IGF-1 включает следующие модификации:

- a) аминокислоты G1, P2 и E3 удалены,
- b) аминокислота G42 заменена на серин и
- c) аминокислота R36 заменена на глутамин или удалена; или аминокислота R37 заменена на глутаминовую кислоту либо пролин или удалена; или аминокислоты R36 и R37 обе заменены на глутамин или удалены.

Кроме того, изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую вариант человеческого белка IGF-1, предназначенный для терапевтического применения.

В другом варианте осуществления изобретения упомянутое выше терапевтическое применение представляет собой лечение мышечного расстройства у пациента, который в этом нуждается. В конкретном варианте осуществления изобретения мышечное расстройство, описанное выше, представляет собой атрофию мышц. Соответственно в некоторых аспектах изобретения терапевтическое применение представляет собой лечение саркопении, связанной с ожирением, саркопении и мышечной атрофии, связанной с диабетом.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - аффинность связывания в отношении IGF-1R. Высокоаффинное связывание hIGF-1 и вариантов IGF-1 с rhIGF1R измеряли с использованием эффекта поверхностного плазмонного резонанса (Biacore).

Фиг. 2(A-D) - фосфорилирование IGF-1R в клетках-трансфектантах NIH3T3-IGF-1R.

Клетки NIH3T3 со сверхэкспрессией рецептора IGF-1 человека (NIH3T3-IGF-1R) культивировали в течение 24 ч в питательной среде, выдерживали в течение 18 ч в бессывороточной среде и стимулировали в течение 10 мин при 37°C эквимоллярными концентрациями указанных пептидов. Уровни фосфорилирования IGF-1R анализировали с помощью ELISA. Фосфорилирование рецептора выражают в виде % от контроля $\pm$ стандартные отклонения (SD) (NIH 3T3 клетки фибробластов эмбриона мыши происходят из клеточной линии, выделенной и иницированной на кафедре патологии медицинского факультета Университета Нью-Йорка; Todaro G.J., Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol. 17:299-313, 1963).

Фиг. 3(A-D) - фосфорилирование InsR в клетках-трансфектантах NIH3T3-InsR.

Клетки NIH3T3 со сверхэкспрессией человеческого рецептора инсулина (NIH3T3-InsR) культивировали в течение 24 ч в питательной среде, выдерживали в течение 18 ч в бессывороточной среде и стимулировали в течение 10 мин при 37°C эквимоллярными концентрациями указанных пептидов. Уровни фосфорилирования InsR анализировали с помощью ELISA. Фосфорилирование рецептора выражают в виде: условные единицы $\pm$ стандартные отклонения (SD).

Фиг. 4(A-C) - фосфорилирование IGF-1R в первичных миобластах человека и яванского макака.

Клетки культивировали в среде роста, выдерживали на бессывороточной среде в течение 4 ч и затем стимулировали hIGF-1 или вариантами hIGF-1 в течение 15 мин при 37°C. Уровни фосфорилирования IGF-1R анализировали с помощью ELISA с использованием набора DuoSet IC human phosphor-IGF1R. Фосфорилирование рецептора выражают в виде % от контроля $\pm$ стандартные отклонения (SD).

Фиг. 5(A-D) - поглощение глюкозы в миобластах мыши и адипоцитах.

Адипоциты линии 3T3-L1 (B и D) и миобласты мыши линии C₂C₁₂ (A и C) высевали на 24-луночные планшеты и культивировали в бессывороточной среде DMEM в течение 4 ч. Затем бессывороточную DMEM заменяли буфером KRP или HBS для адипоцитов 3T3-L1 и C₂C₁₂ соответственно. Клетки обрабатывали в течение 1 ч указанными пептидами при 37°C. Поглощение глюкозы измеряли путем добавления 0,4 (адипоциты) или 0,8 (C₂C₁₂) мк-Ки [³H] 2-деокси-D-глюкозы и 0,1 (адипоциты) или 0,01 (C₂C₁₂) мМ 2-деокси-D-глюкозы в течение 10 (адипоциты) или 5 (C₂C₁₂) мин при комнатной температуре. Радиоактивность анализировали путем подсчета сцинтилляций.

Фиг. 6 - поглощение глюкозы: динамика по времени в адипоцитах.

Адипоциты 3T3-L1 высевали на 24-луночные планшеты и культивировали в бессывороточной среде DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) в течение 4 ч. Затем бессывороточную

среду DMEM заменяли буфером KRP и клетки обрабатывали в течение 15, 60, 90 и 120 мин указанными пептидами при 37°C. Поглощение глюкозы измеряли путем добавления 0,4 мк-Си [³H] 2-деокси-D-глюкозы и 0,1 mM 2-деокси-D-глюкозы в течение 10 мин при комнатной температуре. Радиоактивность анализировали путем подсчета сцинтилляций. 3T3-L1 представляет собой клеточную линию, полученную из клеток 3T3, которую используют в биологических исследованиях на жировой ткани; Green H., Kehinde O. (1975) "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion". Cell 5 (1):19-27.

Фиг. 7(A-B).

Взрослые самцы крыс (n=3/группу) получали внутривенную (в/в) болюсную или подкожную (п/к) инъекцию hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2_A или hIGF-1-Ea-Fc mut 04/2_E в дозе 10 мг/кг. Серийные образцы крови получали через 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 и 336 ч после введения исследуемого материала. Концентрации в сыворотке рекомбинантных белков определяли с помощью ELISA.

Фиг. 8(A-C) - эффекты hIGF-1-Ea-Fc мутантов против дексаметазон-индуцированной мышечной атрофии. Значения изменения массы тела (A) и мышц (B и C) в группах, получавших (A) носитель, (B) Dex, (C) Dex и hIGF-1 в дозе 3,8 мг/кг/день п/к, минипомповая инфузия, (D) Dex и hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2_A в дозе 3 мг/кг/день, п/к через день, (E) Dex и hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2_A в дозе 10 мг/кг/день, п/к через день, и (F) Dex и hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2_A в дозе 3 мг/кг/день, п/к через день, выражают в виде среднего значения $\pm$ SEM (n=4-6). *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001 в сопоставлении с группой B, ####: P<0,001 в сопоставлении с группой A (критерий множественного сравнения Даннетта по результатам ANOVA).

Фиг. 9 - продукция вариантов IGF-1 с различными мутациями G42 в клетках HEK293.

Результаты продукции белка в культуре HEK293F объемом 100 мл, трансфицированной методом FuGene. Титры измеряли с помощью аналитической ВЭЖХ с использованием белка A в очищенных супернатантах клеточных культур. Концентрации измеряли после очистки с использованием белка A. Уровни агрегации очищенных белков измеряли с помощью устройства SEC-MALS.

Фиг. 10 - относительное содержание расщепленного материала hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc (SEQ ID NO:6) (колонка темно-серого цвета) и hIGF1-Ea-hFc mut13/2_A (SEQ ID NO:9) (колонка светло-серого цвета), экспрессированного двумя различными клеточными линиями CHO.

Относительное содержание расщепленного материала определяли в очищенном белке (хроматография с белком A), полученном из трансфицированных клеток, производных от клеток CHO-K1, а также клеток, производных от CHO-DUX11. Относительное содержание расщепленного белка определяли с помощью анализа обращенно-фазной ЖХ/МС. Относительное содержание расщепленного материала существенно ниже для hIGF1-Ea-hFc mut13/2_A в обеих клеточных линиях.

Фиг. 11 - рост клеток, производных CHO-K1, экспрессирующих рекомбинантное антитело (непрерывная линия), и клеток, производных CHO-K1, экспрессирующих hIGF-1Ea 3mut (SEQ ID NO:27) (пунктирная линия), в опытах в биореакторе. В: процент жизнеспособных клеток в опытах в биореакторе (непрерывная линия антителопродуцирующий клон клеток, производных CHO-K1; пунктирная линия - клоны, экспрессирующие hIGF-1 Ea 3mut).

Фиг. 12 - количество жизнеспособных клеток.

Непрерывная линия показывает рост клеток, производных от линии CHO-K1. Во время совместного культивирования с IGF-1 дикого типа или с hIGF-1Ea 3mut клеточный рост ингибируется (пунктирная линия и штриховая линия соответственно). Показано среднее значение, полученное из 3 повторений для биологического препарата. IGF-1/hIGF-1Ea 3mut добавляли на 2-й день (эксперимент с добавлением). В: жизнеспособность клеток: непрерывная линия показывает жизнеспособность клеток, производных от CHO-K1, пунктирная линия и соответственно штриховая линия показывают снижение клеточной жизнеспособности после внесения IGF-1/hIGF-1Ea 3mut. Жизнеспособность клеток уменьшалась на 2 дня раньше, если клетки инкубировали совместно с IGF-1/hIGF-1Ea 3mut. Не обнаружено различий в росте или жизнеспособности клеток при воздействии IGF-1 и hIGF-1Ea 3mut.

Фиг. 13 - показаны рост клеток, производных от линии CHO-DUXB11 (непрерывная линия), и снижение клеточного роста при совместном культивировании с IGF-1Ea 3mut (прерывистые линии). После добавления NVPAEW541, ингибитора тирозинкиназы IGF-1R (сплошная линия со звездочкой), клеточный рост несколько снижался. Совместное культивирование с IGF-1Ea 3mut и добавление ингибитора тирозинкиназы IGF-1R не приводило к дополнительному ингибированию клеточного роста (прерывистая линия со звездочкой).

Фиг. 14 - сплошной линией показан рост клеток дикого типа (WT), производных от линии клеток CHO-K1, и сплошной линией с кружками показан сниженный клеточный рост при совместном культивировании с IGF-1. Пунктирными линиями показан клеточный рост трех КО-клонов с нокаутом гена IGF-1R. Клеточный рост незначительно увеличен по сравнению с клетками, производными от CHO-K1, дикого типа. Совместное культивирование с IGF-1 приводило только к небольшому ингибированию клеточного роста, и клеточный рост являлся сходным с ростом клеток дикого типа, производных от CHO-K1, без совместного культивирования с IGF-1.

Фиг. 15 - представлены титры слитого белка IGF-1-Fc, полученного в 14-дневных культурах одного

производственного цикла (суммарный уровень). Выделены уровни экспрессии 7 различных слитых белков IGF-1-Fc в 5 различных клеточных линиях. Экспрессия слитых белков IGF-1-Fc была выше в 5-20 раз в клеточных линиях IGF-1R-KO, производных от CHO-K1, CHO-DUXB11, а также в клеточных линиях, полученных из CHO-DUXB11 с помощью shPHK (сниженная экспрессия IGF-1R и INSR), по сравнению с клеточными линиями дикого типа, производными от клеток CHO-K1 или CHO-DUXB11.

Фиг. 16 - слитые белки IGF-1-Fc, полученные в 14-дневных культурах одного производственного цикла в 50-мл встряхиваемых колбах. Титры слитого белка IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-fc_mut 13/2_A в 15 лучших клонах IGF-1R-KO, производных от клеток CHO-DUXB11, приблизительно в 6-7 раз выше по сравнению с титром гибридного белка IGF-1-Fc: hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc домен в клеточных клонах дикого типа, производных от CHO-DUXB11.

Фиг. 17 - продукция вариантов IGF-1 в клетках HEK293F и их ответ на воздействие белков.

Представлены результаты продукции в культуре клеток HEK293T объемом 100 мл, трансфицированных PEI. Выход белка после очистки с использованием белка А экстраполировали на культуру объемом 1 л. Агрегацию измеряли методом SEC-MALS после очистки с использованием белка А. Очищенные белки инкубировали со средами, кондиционированными клетками CHOK1, производными от клеток линии CHO, в течение 5 дней и клетками, производными от клеток линии CHO-DUXB11, в течение 20 дней. Показан процент оставшегося полноразмерного белка. Способ описан в примере 2.

Фиг. 18 - фосфорилирование InsR в клетках-трансфектантах NIH3T3-InsR.

Клетки NIH3T3, сверхэкспрессирующие рецептор инсулина человека (NIH3T3-InsR), культивировали в течение 24 ч в питательной среде, выдерживали в течение 18 ч в бессывороточной среде и стимулировали в течение 10 мин при 37°C эквимоллярными концентрациями указанных пептидов. Уровни фосфорилирования InsR анализировали с помощью ELISA. Фосфорилирование рецептора выражается в виде условные единицы ± стандартные отклонения (SD).

Фиг. 19 - поглощение глюкозы в миоцитах мыши и адипоцитах.

Адипоциты 3T3-L1 (A) и миоциты мыши C2C12 (B) высевали на 24-луночные планшеты и культивировали в бессывороточной среде DMEM в течение 4 ч. Затем бессывороточную среду DMEM заменяли на буфер KRP или HBS для адипоцитов 3T3-L1 и C2C12 соответственно. Клетки обрабатывали в течение 1 ч указанными пептидами при 37°C. Поглощение глюкозы измеряли путем добавления 0,4 (адипоциты) или 0,8 (C2C12) мк-Си [³H] 2-деокси-D-глюкозы и 0,1 (адипоциты) или 0,01 (C2C12) мМ 2-деокси-D-глюкозы в течение 10 (адипоциты) или 5 (C2C12) мин при комнатной температуре. Радиоактивность анализировали путем подсчета сцинтилляций.

Основные понятия

Для лучшего понимания настоящего изобретения вначале описаны определенные термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

"Содержащий": термин "содержащий" означает "включающий", например композиция, "содержащая" X, может состоять только из X или может дополнительно что-то включать, например X+Y.

Символ "A" или буквы "d" или "D": в контексте описания белка (например, "hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc домен" или "hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc домен") относится к делеции аминокислоты. В качестве примера, термин "D71-72, 77" (в контексте белка hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc) описывает тот факт, что аминокислоты 71, 72 и 77 были удалены.

Белок инсулиноподобного фактора роста 1 или его вариант: фраза "белок инсулиноподобного фактора роста 1 или его вариант" относится к белкам, которые кодируются генами инсулиноподобного фактора роста 1, особенно предпочтительным является человеческий белок инсулиноподобного фактора роста 1 (hIGF-1) или его варианты. Вариант белка IGF-1 представляет собой белок, который отличается по меньшей мере одной аминокислотой от последовательности дикого типа IGF-1, где термин "последовательность дикого типа" относится к полипептиду или генной последовательности, доступной по меньшей мере в одном природном организме или в полипептиде или в генной последовательности, которые не были изменены, подвергнуты мутации или другим манипуляциям со стороны человека. Термины "вариант IGF-1" и "миметик IGF-1" используются взаимозаменяемо в настоящем документе. Вариант IGF-1 также представляет собой белок-предшественник IGF-1 или белок про-IGF-1, содержащий пептидную лидерную последовательность. Вариант IGF-1 также представляет собой слитый белок, содержащий белок IGF-1, например белок, содержащий белок IGF-1, слитый с Fc-участком иммуноглобулина. Примеры вариантов IGF-1 описаны, в частности, в патентных заявках WO05033134 (стабилизированный белок IGF-1, слитый с Fc-участком иммуноглобулина) и WO2007146689 (стабилизированные белки-предшественники IGF-1). Вариант IGF-1, как описано выше, сохраняет свою биологическую активность в том смысле, что, например, белок можно рассматривать как функциональный эквивалент IGF-1 дикого типа.

Термин "функциональные эквиваленты" применительно к белку IGF-1 следует понимать, как белки IGF-1, содержащие естественную или искусственную мутацию. Мутации могут представлять собой вставки, делеции или замены одной или нескольких нуклеиновых кислот, которые не уменьшают биологическую активность белка IGF-1. Функциональные эквиваленты обладают идентичностью по меньшей

мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90%, наиболее предпочтительно свыше 95%, особенно предпочтительно по меньшей мере 98%, но меньше, чем идентичность 100%, с белком IGF-1 дикого типа, например с белком человека IGF-1 SEQ ID NO:1. В случае слитых белков, как описано выше, идентичность 100% определяется только на основе части IGF-1 такого слитого белка.

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) являются частью сложной системы, которую клетки используют для связи со своим физиологическим окружением. Указанная сложная система (которую часто называют осью инсулиноподобных факторов роста) состоит из двух расположенных на клеточной поверхности рецепторов (IGF-1R и IGF-2R), двух лигандов (IGF-1 и IGF-2), семейства, состоящего из шести обладающих высокой аффинностью к связыванию IGF белков (IGFBP 1-6), и ассоциированных с IGFBP расщепляющих ферментов (протеаз). Указанная система важна не только для регуляции в нормальном физиологическом состоянии, но также она участвует в некоторых патологических состояниях (Glass, Nat Cell Biol. 5:87-90, 2003). Установлено, что ось IGF играет роль в усилении клеточной пролиферации и ингибировании клеточной гибели (апоптоз). IGF-1 секретируется главным образом печенью в результате стимуляции человеческим гормоном роста (hGH). IGF-1 оказывает воздействие почти на все клетки в организме человека, прежде всего, на клетки мышц, хрящей, костей, печени, почек, нервов, кожи и легких. Помимо инсулиноподобного действия, IGF-1 может регулировать также рост клеток. IGF-1 и IGF-2 регулируются семейством генных продуктов, которые известны как IGF-связывающие белки. Эти белки способствуют модуляции действия IGF сложными путями, которые включают как ингибирование действия IGF в результате предотвращения связывания с IGF-рецепторами, так и усиление действия IGF путем облегчения доставки к рецепторам и увеличения времени полужизни IGF в кровотоке. Существует по меньшей мере шесть обладающих способностью к связыванию с IGF белков (IGFBP1-6). IGF-1 применяется в лечебных целях в широком диапазоне. Мекасермин (торговое наименование Instelex™) является синтетическим аналогом IGF-1, который одобрен для лечения недостаточности роста. Несколько компаний проводили оценку IGF-1 в клинических испытаниях в отношении ряда дополнительных показаний, включая сахарный диабет 1 типа, диабет 2 типа, боковой амиотрофический склероз, тяжелое ожоговое повреждение и миотическую мышечную дистрофию. Для ясности и единообразия нумерация аминокислотных остатков в предшественниках или зрелых белках IGF-1 в контексте настоящего описания и в формуле изобретения основана на нумерации в последовательности белка-предшественника дикого типа человеческого инсулиноподобного фактора роста 1 (соматомедин C), форма CRA с (номер доступа EAW97697) без сигнального пептида (т.е. SEQ ID NO:5).

Клетка млекопитающего: термин "клетка млекопитающего" в контексте описанного способа относится к клеткам млекопитающих, которые подходят для производства белка в промышленном масштабе. Эти клетки хорошо известны специалистам в данной области, и они выделены, например, из видов *Citellus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* и *Chlorocebus species*. Соответствующие клеточные линии известны как CHO-клетки (клетки яичника китайского хомяка), COS-клетки (клеточная линия, полученная из клеток почек обезьян (африканской зеленой мартышки)), Vero-клетки (клетки почечного эпителия, выделенные из африканской зеленой мартышки), Hela-клетки (линия получена из клеток рака шейки матки, выделенных у Генриетты Лаке), BHK-клетки (клетки почки хомячка), HEK-клетки (клетки эмбриотической почки человека), NSO-клетки (линия клеток мышинной миеломы), C127-клетки (нетуморогенная линия клеток мыши), PerC6®-клетки (линия клеток человека, Crucell), CAP-клетки (система CEVEC, основанная на человеческих амниоцитах) и Sp-2/0-клетки (клетки миеломы мышей).

Термин "рецепторная специфичность стабилизированных белков IGF-1 предшествующего уровня техники" в контексте настоящего изобретения относится также к сниженной способности индуцировать фосфорилирование рецептора инсулина (сниженная активность и/или эффективность) молекул IGF-1 по изобретению по сравнению с вариантами IGF-1 предшествующего уровня техники, которая уменьшает риск индукции гипогликемии, нежелательное явление, вызывающее терапевтические опасения.

Предшественник: в дальнейшем термин "предшественник", когда он используется в контексте настоящего изобретения, относится к предшественнику зрелого белка IGF-1 человека без сигнального пептида, но включающему Ea-, Eb- и Ec-пептид соответственно.

Подробное описание изобретения

Молекулы, содержащие Ea-пептид, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, где белковые остатки G1, P2, E3, R71 и S72 удалены, аминокислота R77 удалена или замещена на глутамин и аминокислота R37 замещена на аланин (hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, 77-fc домен (SEQ ID NO:6) и hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R77Q-fc домен (SEQ ID NO:7)), были произведены и испытаны. Экспрессия hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc домен (SEQ ID NO:6) в клеточной системе млекопитающих была невозможна в связи с проблемами агрегации и деградации (свыше 90% произведенного белка разрушалось; см. фиг. 10).

Кроме того, белки hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc домен (SEQ ID NO:6) показали снижение рецепторной специфичности по сравнению с немодифицированным зрелым IGF-1 в анализе фосфорилирования NIH3T3 InsR (см. фиг. 3).

Следовательно, варианты предшественника IGF-1, слитого с Fc-участком иммуноглобулина человека, являются неудовлетворительными лекарствами-кандидатами в связи с (i) низкой производительностью производственной системы млекопитающих и (ii) повышенной аффинностью связывания с инсулиновым рецептором (InsR) по сравнению с немодифицированным человеческим IGF-1 дикого типа, которая может привести к гипогликемии, нежелательному явлению, вызывающему терапевтические опасения. Изобретение основано на неожиданном наблюдении, что (1) производительность продуктивных клеточных систем млекопитающих и (2) рецепторная специфичность нативных белков IGF-1 или стабилизированных белков IGF-1 предыдущего уровня техники могут быть улучшены путем введения дополнительных мутаций определенных аминокислот, где различные мутации позволяют решить различные проблемы и где указанные мутации можно сочетать для решения нескольких проблем, связанных с продуктивностью, эффективностью и/или рецепторной специфичностью.

Особенно неожиданным результатом было наблюдение, что человеческий белок IGF-1 (SEQ ID NO:1), который подвергали мутациям в положении G42 (замены G42S), вызывал сниженное поглощение глюкозы в *in vitro* системах миоцитов (C2C12) и адипоцитов (3T3-L1) по сравнению с немодифицированным человеческим IGF-1 дикого типа, что может уменьшить риск гипогликемии при лечении IGF-1 *in vivo* (фиг. 18).

Кроме того, особенно удивительным результатом было наблюдение, что белки человеческого предшественника IGF-1 предшествующего уровня техники, которые подвергали мутациям в положении G42 (делеция или специфические мутации), демонстрируют сходную способность к стимуляции фосфорилирования инсулинового рецептора (InsR), как и немодифицированный человеческий IGF-1 дикого типа, что уменьшает риск гипогликемии вариантов IGF-1 предшествующего уровня техники (фиг. 3). Еще более удивительным было наблюдение, что мутация G42S оказывает дополнительное положительное влияние на выход продукции белков человеческого предшественника IGF-1 предшествующего уровня техники, которые сливают с Fc-участком иммуноглобулина в клетке млекопитающего (фиг. 10/17), т.е. образование агрегатов, оказывающих негативное действие на выход продукции, может быть существенно снижено путем введения мутации G42S (фиг. 9/17). Следовательно, изобретение в некоторой степени основано на неожиданном открытии, что путем манипуляций с аминокислотой глицин 42 в человеческом белке IGF-1 или в вариантах человеческого предшественника IGF-1 можно преодолеть две главные технические проблемы в создании терапевтических вариантов IGF-1. В другом аспекте данное изобретение обеспечивает решение проблемы, связанной с тем, что белки-предшественники IGF-1 предшествующего уровня техники, которые сливают с Fc-участком иммуноглобулина IgG человека, не могут быть получены в промышленном масштабе в клетках млекопитающих, так как указанные слитые белки легко разрушаются протеазами клеток млекопитающих. Следовательно, в другом аспекте данное изобретение основано на неожиданном открытии, что с помощью манипуляций со специфическими аминокислотами в вариантах предшественника IGF-1 Eа-пептид можно решить другую важную техническую проблему создания терапевтических вариантов предшественника IGF-1.

Примеры таких молекул включают, но без ограничения, следующие полипептиды.

Белок человека IGF-1 (SEQ ID NO:1), в котором аминокислоту G42 удаляют.

Белок человека IGF-1 (SEQ ID NO:1), в котором аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин.

Белок человека IGF-1 (SEQ ID NO:1), в котором аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и в котором аминокислоту(ы):

- (a) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R36 заменяют или удаляют; или
- (b) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q); или
- (c) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют или удаляют; или
- (d) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E); или
- (e) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют на аланин; или
- (f) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют на пролин (P); или
- (g) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоты R36 и R37 заменяют или удаляют; или
- (h) G1, P2, E3 удаляют и аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q); или
- (i) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и R37 заменяют на аланин.

Белок человека IGF-1 (SEQ ID NO:1), в котором аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и в котором аминокислоту E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют на аланин.

Белок человека IGF-1 (SEQ ID NO:1), в котором аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и в котором аминокислоту E3 удаляют и аминокислоту R37 заменяют на аланин, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, в частности с модифицированным Fc-участком, в частности с Fc-участком, который модифицируют для модуляции связывания с Fc-рецептором, как описано ниже.

Другой полипептид по изобретению представляет собой белок человека IGF-1 с последовательностью SEQ ID NO:117.

Другой полипептид по изобретению представляет собой белок-предшественник человека IGF-1 с последовательностью SEQ ID NO:118.

Обнаружено, что мутация или делеция аминокислот R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101,

N102, Y103, Q104 и/или M 105 в белках-предшественниках IGF-1 Еа-пептид предшествующего уровня техники, упомянутых выше, приводит к более высокому выходу недеградированного белка при экспрессии клетками млекопитающих. Кроме того, обнаружено, что комбинация упомянутых мутаций/делеций в положениях R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 и/или M105 приводит к синергическому эффекту. Следовательно, в одном варианте осуществления R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 и/или M105, при условии, что модифицированный белок IGF-1 содержит Еа-пептид (SEQ ID NO:2), удаляют или заменяют в описанных в настоящем документе модифицированных белках-предшественниках IGF-1. В одном варианте осуществления R74, R77 и/или R104 заменяют на Q в описанных в настоящем документе белках-предшественниках IGF-1. В другом варианте осуществления K68, S69, A70, R71 и/или R72 могут быть дополнительно удалены или изменены в описанных модифицированных белках-предшественниках IGF-1.

Таким образом, изобретение предлагает полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник IGF-1, т.е. содержащий Еа-пептид человеческого IGF-1, где аминокислоту глицин в положении 42 удаляют или заменяют другой аминокислотой и где нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO:5. Е-пептид может представлять собой Еа-, Еb- или Ес-пептид (SEQ ID NO:2-4). В конкретном варианте осуществления аминокислоту глицин в положении 42 удаляют или заменяют на аминокислоту серин.

В одном варианте осуществления описанный выше человеческий белок-предшественник IGF-1 Еа-пептид, который изменяют в положении G42, как описано выше (удаляют или заменяют на серин), содержит дополнительные делеции и/или мутации аминокислот G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 и/или M105, где нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO:5.

Примеры таких молекул включают, но без ограничения, следующие полипептиды.

Полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник IGF-1 Еа-пептид, в котором аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и в котором аминокислоту(ы):

- (1) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (2) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (3) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (4) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (5) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (6) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (7) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (8) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (9) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты R71 и S72 удаляют;
- (10) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R77 заменяют на глутамин (Q);
- (11) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);
- (12) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и Q104 заменяют на глутамин (Q);
- (13) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);
- (14) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);
- (15) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);
- (16) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R77 заменяют на глутамин (Q);
- (17) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);
- (18) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);
- (19) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A) и аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(22a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(23a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(24a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин;

(25a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(26a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(27a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(28a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);

(29a) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

В другом варианте осуществления изобретение относится к описанным выше белкам, содержащим полипептиды (1)-(29a), где указанные молекулы, в которых вместо изменений в положениях 1-3 только удаляют аминокислоту E3 (например, молекула (28a)), также могут обозначать полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник IGF-1 Ea-пептид, где аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и где аминокислоту E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

Кроме того, изобретение относится к полипептиду, содержащему человеческий белок-предшественник IGF-1, т.е. содержащему Ea-пептид человеческого IGF-1, который сливают с Fc-участком иммуноглобулина, и где аминокислоту глицин в положении 42 заменяют на другую аминокислоту и где нумерация аминокислот части IGF-1 указанного белка соответствует SEQ ID NO:5. E-пептид может представлять собой Ea-, Eb- или Ec-пептид, и аминокислота, которой заменяют глицин в положении 42, является серином.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, содержащему человеческий белок-предшественник IGF-1: (a) где аминокислоту G42 удаляют или заменяют на аминокислоту серин и (b) который связан с Fc-участком иммуноглобулина, в частности с модифицированным Fc-участком, в частности с Fc-участком, который модифицируют для модуляции связывания с Fc-рецептором. Например, одна или несколько аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что Fc-участок имеет измененную аффинность к Fc-рецептору или C1 компоненту комплекса. Так называемые молчащие Fc-области иммуноглобулина описаны в данной области: LALA и N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20 (6): 685-691) и D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181:6664-69; Strohl, W., выше). Примеры молчащих Fc-вариантов антител IgG1 включают так называемый мутант LALA, содержащий мутацию L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc-фрагмента IgG1. Другой пример молчащего антитела IgG1 содержит мутацию D265A. Другое молчащее антитело IgG1 содержит мутацию N297A, которая дает в результате агликозилированные/негликозилированные антитела.

Упомянутый выше подход с использованием мутации LALA описан более подробно в US5624821 и US5648260 Winter et al. Таким образом, в одном варианте осуществления описанный белок-предшественник hIGF-1 сливают с Fc-участком, содержащим мутацию L234A и L235A или мутацию D265A или мутацию N297A. Такие конструкции Fc LALA, D265A или N297A имеют сниженную ADCC-активность.

В одном варианте осуществления полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник IGF-1 Ea-пептид, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, где аминокислоту глицин в положении 42 заменяют на аминокислоту серин, содержит дополнительные делеции и/или мутации аминокислот G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77 и/или R104.

Примеры таких молекул включают, но без ограничения, следующие полипептиды.

Полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник, IGF-1 Ea-пептид, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, в котором аминокислоту глицин в положении 42 заменяют на аминокислоту серин, в котором нумерация аминокислот в части IGF-1 указанного белка соответствует SEQ ID NO:5 и в котором аминокислот(ы):

(1b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют;

(2b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты R71 и S72 удаляют;

(3b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют или удаляют и аминокислоты R71 и S72 удаляют;

(6с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют;

(7с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 заменяют или удаляют и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют;

(8с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют;

(9с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют;

(10с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(11с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(12с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют или удаляют и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и Q104 заменяют на глутамин (Q);

(13с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(14с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(15с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);

(16с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(17с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(18с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);

(19с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(20с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(21с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин;

(22с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(23с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(24с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);

(25с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q);

(26с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(27с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q);

(28с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q);

(29с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

В другом варианте осуществления изобретение относится к описанным выше белкам, содержащим описанные выше полипептиды (1b)-(29с), где в указанных молекулах вместо введения мутаций в положениях 1-3 только удаляют аминокислоту E3 (например, молекула (28с) также может обозначать полипептид, содержащий человеческий белок-предшественник IGF-1, слитый с Fc-участком иммуноглобулина, где аминокислоту G42 заменяют на аминокислоту серин и где аминокислоту(ы) E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q)).

В другом варианте осуществления изобретение относится к описанным выше полипептидам (например, полипептидам 1-29с), содержащим измененный E-пептид, состоящий из аминокислот:

a) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG (SEQ ID NO:25), или

b) VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNKTSQRRKGS (SEQ ID NO:26),

c) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGRGSAGNKNYQM (SEQ NO:115).

В другом варианте осуществления изобретение относится к описанному выше белку-предшественнику IGF-1, который соединяют с Fc-участком, где Fc-участок может быть соединен непосредственно с модифицированным полипептидом предшественника IGF-1 или может быть присоединен с помощью шарнирного участка с использованием технологий рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области. Если используют ДНК шарнирного участка, Fc-участок может быть присоединен к любой части модифицированного полипептида предшественника IGF-1. В одном варианте осуществления Fc-участок соединяют непосредственно с С-концом модифицированного полипептида предшественника IGF-1. В другом варианте осуществления Fc-участок связывают с С-концом модифицированного полипептида предшественника IGF-1 с помощью линкера Gly Ser (-GS-).

Можно использовать ДНК-линкер для обеспечения сайта рестрикции между компонентами для удобства в работе. Линкер также может быть предусмотрен для усиления экспрессии полипептида в клетке-хозяине, уменьшения стерического несоответствия, в результате чего компонент может принимать оптимальную третичную или четвертичную структуру и/или взаимодействовать соответствующим образом с молекулой-мишенью. Относительно линкеров и способов идентификации подходящих спейсеров см., например, George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879.

Линкерная последовательность может включать одну или несколько аминокислот, соединенных естественным образом с рецепторным компонентом, или может представлять собой добавленную последовательность, используемую для увеличения экспрессии слитого белка, специфического предоставления желаемых сайтов, представляющих интерес, что позволяет доменам компонента формировать оптимальные третичные структуры, и/или для усиления взаимодействия компонента с молекулой-мишенью. В одном варианте осуществления линкер содержит одну или несколько пептидных последовательностей, длина которых составляет 1-100 аминокислот, предпочтительно 1-25 аминокислот. В одном варианте осуществления длина линкера составляет 1-5 аминокислот. В одном варианте осуществления линкер представляет собой последовательность из трех аминокислот; более конкретно, аминокислотную последовательность из Gly Pro Gly. В другом варианте осуществления линкер представляет собой Gly Ser.

Примеры таких молекул шарниров включают, но без ограничения, следующие полипептиды:

шарнир 1: CPPCPA (SEQ ID NO:22),
 шарнир 2: DKTHTCPPCPA (SEQ ID NO:23),
 шарнир 3: EPKSCDKTHTCPPCPA (SEQ ID NO:24).

Следовательно, изобретение относится к полипептиду, содержащему человеческий белок-предшественник IGF-1 Ea-пептид, который соединен с Fc-участком иммуноглобулина, в частности с модифицированным Fc-участком, в частности с Fc-участком, который модифицируют для модуляции связывания с Fc-рецептором, предпочтительно с помощью замены одной или обеих аминокислот 234 и 235 на аланин, как описано выше, где аминокислоту глицин в положении 42 заменяют на серин, где нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO:5 и где Fc-участок иммуноглобулина соединяют с белком-предшественником IGF-1 с помощью шарнирного участка.

Примеры таких молекул включают, но без ограничения, следующие полипептиды:

hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID NO:8),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID NO:9),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (SEQ ID NO:10),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (SEQ ID NO:11),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID NO:12),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (SEQ ID NO:13),
 hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO:14).

В одном конкретном варианте осуществления изобретения аминокислоты R71 и S72 описанных выше белков-предшественников IGF-1 могут быть изменены, как описано далее:

- (1) делеция одной или обеих R71 и S72, и/или
- (2) замена одной или обеих R71 и S72 на неосновную аминокислоту, такую как аланин, и/или
- (3) вставка одной или нескольких неосновных аминокислот между R71 и S72, и/или
- (4) размещение сайта гликозилирования около R71 и S72 достаточно, чтобы маскировать участок воздействия протеазы, и/или
- (5) сайт-направленное пегилирование с использованием замещения R71 или S72, или вставки около или между R71 и S72, неприродной аминокислоты.

Способы модификации белка, такие как сайт-направленный мутагенез, введение сайтов гликозилирования или сайт-направленное пегилирование, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В одном варианте осуществления Fc-участок модифицируют для модуляции связывания с Fc-рецептором. В одном варианте осуществления Fc-участок модифицируют для уменьшения аффинности к Fc-рецептору. В одном варианте осуществления Fc-участок модифицируют для уменьшения активности ADCC. В одном варианте осуществления Fc-участок модифицируют для предотвращения активности

ADCC.

В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:8 (hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_E). В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:9 (hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_A). В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:10 (hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_C). В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:11 (hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_F). В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:12 (hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_E).

В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:13 (hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_A).

В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, содержащий SEQ ID NO:14 (hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_F).

В одном варианте осуществления изобретение предлагает полипептид, состоящий из SEQ ID NO:8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:9. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:12. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает полипептид, который по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления полипептиды по настоящему изобретению гликозилируют.

Мутации аминокислот.

Как указано выше, различные аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту. Обычно аминокислоту заменяют остатком аланина. Однако можно использовать другие аминокислоты, например неприродные аминокислоты или природные аминокислоты другой группы (например, полярные, кислые, основные или неполярные). Способы введения мутации в аминокислоты белка хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Способы включают, но не ограничиваются ими, амплификацию ДНК, кодирующей функционально-активный вариант полипептида или его фрагменты с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), осуществляемую с мутагенными праймерами, и сборку фрагментов с помощью ПЦР-сборки при необходимости или введение мутаций с использованием коммерчески доступных наборов, таких как "QuikChange.TM. Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) (см., например, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Кроме того, мутированные последовательности могут быть получены путем синтеза искусственных генов, сервиса, предоставляемого коммерческими компаниями (например, Geneart, Life Technology). Создание функционально-активного варианта полипептида или производного полипептида путем замены аминокислоты, которая не влияет на функцию полипептида, может быть осуществлено специалистом в данной области.

Fc-участки иммуноглобулинов.

В одном варианте осуществления Fc-участок получают из IgG, IgM или IgA. В одном варианте осуществления Fc-участок происходит из IgG. Fc-домен IgG может быть выбран из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также из любого аллотипа в пределах группы каждого изоформа. В одном варианте осуществления Fc-участок является Fc-участком человека.

Fc-участок может быть изменен путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций Fc-участка. Например, одна или несколько аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что Fc-участок имеет измененную аффинность к Fc-рецептору или C1 компоненту комплемента. Указанный подход более подробно описан в US5624821 и US5648260, Winter et al. В частности, могут быть заменены остатки 234 и 235. В частности, указанные мутации могут быть заменены на аланин. Таким образом, в

одном варианте осуществления антитело по изобретению имеет мутацию в Fc-участке в одной или обеих аминокислотах 234 и 235. В другом варианте осуществления одна или обе аминокислоты 234 и 235 могут быть заменены на аланин. Такой Fc-вариант, в котором остатки 234 и 235 заменены на аланин, обычно обозначают как "LALA". Такие конструкции Fc LALA имеют сниженную активность ADCC. В одном варианте осуществления белок-предшественник IGF-1 связывают с Fc LALA IgG1.

Связывание

Термин "слитый" или "связанный", используемый в описании в контексте раскрытых белков, слитых/связанных с Fc-участком иммуноглобулина, означает объединение двух полипептидов, которые в природе не присутствуют в одном полипептиде.

Fc-участок иммуноглобулина может быть непосредственно слит с модифицированным полипептидом IGF-1 или может быть присоединен с помощью линкера с использованием технологий рекомбинантных ДНК, хорошо известных в данной области. Если используют ДНК-линкер, Fc-участок может быть присоединен к любой части модифицированного полипептида IGF-1. В одном варианте осуществления Fc-участок соединяют непосредственно с С-концом модифицированного полипептида IGF-1. В другом варианте осуществления Fc-участок связывают с С-концом модифицированного полипептида IGF-1 с помощью линкера Gly Ser (-GS-) и/или шарнирного участка (SEQ ID NO:22-24), как, например, в случае hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_E (SEQ ID NO:8), hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_A (SEQ ID NO:9), hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_C (SEQ ID NO:10), hIgF1-Ea-Fc mut 13/2_F (SEQ ID NO:11), hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_E (SEQ ID NO:12), hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_A (SEQ ID NO:13) или hIgF1-Ea-Fc mut 04/2_F (SEQ ID NO:14).

ДНК-линкер можно использовать для получения сайта рестрикции между компонентами для упрощения манипуляций. Линкер также может быть предоставлен для усиления экспрессии полипептида в клетке-хозяине, для уменьшения стерического несоответствия, благодаря чему компонент сможет принять оптимальную третичную или четвертичную структуру и/или взаимодействовать соответствующим образом с молекулой-мишенью. В отношении линкеров и способов идентификации подходящих спейсеров см., например, George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879.

Линкерная последовательность может включать одну или несколько аминокислот, соединенных в природных условиях с рецепторным компонентом, или может представлять собой добавленную последовательность, используемую для усиления экспрессии слитого белка, для специфического предоставления заданных сайтов, представляющих интерес, позволяющих доменам компонента формировать оптимальные третичные структуры, и/или для усиления взаимодействия компонента с молекулой-мишенью. В одном варианте осуществления линкер содержит одну или несколько пептидных последовательностей, длина которых составляет 1-100 аминокислот, предпочтительно 1-25 аминокислот. В одном варианте осуществления длина линкера составляет 1-5 аминокислот. В одном варианте осуществления линкер представляет собой последовательность из трех аминокислот; более подробно, последовательность из трех аминокислот Gly Pro Gly. В другом варианте осуществления линкер представляет собой Gly Ser.

Нуклеиновые кислоты.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды согласно изобретению. Предпочтительными последовательностями нуклеиновых кислот являются последовательности, кодирующие hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A или hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (SEQ ID NO:15-21). Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме РНК, такой как мРНК, или в форме ДНК, включая, например, кДНК или синтетическую ДНК. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть двухцепочечными или одноцепочечными. Одноцепочечная ДНК может представлять собой кодирующую цепь, также известную как смысловая цепь, или может представлять собой не кодирующую цепь, также известную как антисмысловая цепь.

Хорошо известна вырожденность генетического кода. При этом две или более различных последовательностей нуклеиновых кислот могут кодировать одну и ту же полипептидную последовательность. Такие вариантные последовательности нуклеиновых кислот включены в объем заявки. В действительности может быть предпочтительно производить консервативные модификации последовательности нуклеиновой кислоты для улучшения экспрессии полипептида согласно изобретению.

Изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению. Вектор может быть вектором клонирования или вектором экспрессии. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может быть включена в вектор экспрессии, несущей элементы, необходимые для эффективной экспрессии, хорошо известные специалисту в данной области. Элементы включают, например, промотор, такой как, например, усилитель-промотор цитомегаловируса (CMV), сигнальную последовательность для секреции, такую как природная или любая другая последовательность, известная как способствующая секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции, например, выделенный из гена бычьего гормона роста (BGH), элемент, обеспечивающий эпизомную репликацию и репликацию в прокариотах (например, SV40 origin и ColE1 или другие элементы, известные в данной области), и элементы, обеспечивающие селекцию, такие как ген устойчивости к ампициллину и ген-маркер устойчивости к зеоцину или гиромизину.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой ки-

слоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:15, или комплементарной ей последовательности;
- b) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:15;
- c) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:16, или комплементарной ей последовательности;
- d) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:16;
- e) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:17, или комплементарной ей последовательности;
- f) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:17;
- g) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:18, или комплементарной ей последовательности;
- h) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:18;
- i) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:19, или комплементарной ей последовательности;
- j) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:19;
- k) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:20, или комплементарной ей последовательности;
- l) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:20;
- m) полинуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO:21, или комплементарной ей последовательности;
- n) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% полноразмерной последовательности, описанной в SEQ ID NO:21.

В другом варианте осуществления изобретение относится к описанным выше вариантным полипептидам IGF-1, где указанные человеческие белки-предшественники IGF-1 пегилируют.

Пегилирование является особенно предпочтительным для белков-предшественников IGF-1, которые не слиты с Fc-участком иммуноглобулина IgG человека. Конъюгация с поли(этиленгликолем) (ПЭГ; пегилирование) оказалась полезной в увеличении времени полужизни терапевтических белковых препаратов. Предполагается, что пегилирование полипептидов предшественника IGF по изобретению может обеспечить в результате аналогичные фармацевтические преимущества. Способы пегилирования IGF-1 хорошо известны в данной области; см., например, опубликованную патентную заявку США 2006/0154865, в которой описаны полезные свойства лизин-монопегилированного IGF-1. Такое лизин-монопегилирование можно адаптировать для полипептидов предшественника IGF по изобретению. Кроме того, пегилирование может быть достигнуто в любой части полипептида по изобретению путем введения неприродной аминокислоты. Определенные неприродные аминокислоты могут быть введены с помощью технологии, описанной в Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-1 1783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004 или в патенте США № 7083970. Вкратце, некоторые из этих систем экспрессии включают сайт-направленный мутагенез для введения нонсенс-кодона, например маркера амберный триплет, в открытую рамку считывания, кодирующую полипептид по изобретению. Такие векторы экспрессии затем вводят в хозяина, который может использовать тРНК, специфическую для введенного нонсенс-кодона и несутщую выбранную неприродную аминокислоту. Конкретные неприродные аминокислоты, которые яв-

ляются полезными для целей конъюгации фрагментов с полипептидами по изобретению, включают аминокислоты, содержащие ацетилен или азидогруппу в боковых цепях. Полипептиды предшественника IGF, содержащие указанные новые аминокислоты, могут быть затем пегилированы в указанных выбранных участках белка. Кроме того, такие пегилированные молекулы IGF без E-пептида также могут быть использованы в качестве терапевтических средств.

Продукция вариантов IGF-1 по изобретению в клетках млекопитающих.

Продукция нативного человеческого IGF-1 в прокариотических системах экспрессии хорошо известна специалистам в данной области. Экспрессия в эукариотических клетках, в частности в клетках млекопитающих, в ряде случаев является предпочтительной, поскольку такие эукариотические клетки являются более подходящими, чем прокариотические клетки, для сборки и секреции правильно уложенного и иммунологически активного белка.

Клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению включают клетки яичника китайского хомячка (CHO-клетки) (включая dhfr-CHO клетки, описанные Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), клетки HEK293 (линия клеток эмбриотической почки человека 293), клетки миеломы мышей NSO, клетки COS и клетки SP2. Предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки, производные от CHO-K1. Однако экспрессия рекомбинантного IGF-1 в клеточных линиях CHO вызывает ингибирование клеточного роста и низкие титры (см. фиг. 11/12). Стабильный нокдаун/нокаут гена IGF-1-R в клетках CHO с использованием технологии "нуклеаза белкового домена "цинковые пальцы" давал в результате увеличение клеточного роста и более высокие титры белка IGF-1 (фиг. 14-16). Клетки CHO со сниженной экспрессией IGF-1-R (si/shPHK нокдаун), которые были стабильно трансфицированы плазмидами, кодирующими IGF-1, производили приблизительно в 5 раз более высокий общий титр по сравнению со стабильно трансфицированными клетками CHO дикого типа. Еще более высокий общий титр может быть измерен после стабильной трансфекции клеточных линий, нокаутных по гену IGF-1-R. Можно обнаружить увеличение титра рекомбинантного IGF-1 в 5-20 раз по сравнению с клеточной линией CHO дикого типа. В целом эти данные показывают, что нокдаун или нокаут генов рецепторов IGF-1 в линии клеток млекопитающих может значительно улучшить производство IGF-1 и его вариантов.

Таким образом, подходящий способ производства рекомбинантного IGF-1 или его вариантов в клетках млекопитающих, например в клетке CHO, где указанная клетка млекопитающего является дефицитной по экспрессии функционального рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), включает следующие стадии:

- a) получение клетки млекопитающего, которая является дефицитной по экспрессии гена рецептора инсулиноподобного фактора роста 1;
- b) трансформация клетки, полученной на стадии (a), с помощью экспрессионного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IGF-1 или его вариант;
- c) отбор клетки, полученной на стадии (b), которую трансформировали;
- d) культивирование клетки, отобранной на стадии (c), в условиях, обеспечивающих экспрессию IGF-1 или его варианта; и
- e) получение IGF-1 или его варианта из клеток млекопитающего, культивируемых на стадии (d), где при другом подходе порядок стадий (a) и (b) может быть изменен, или обе стадии могут быть осуществлены одновременно.

Специалисту в данной области известно, как провести трансформацию, отбор и культивирование генетически модифицированных клеток млекопитающих, например клеток CHO, таких как клетки, производные CHO-K1, клетки, производные CHO-DUXB11, или клетки CHO-DG44. Протоколы селекции обычно используются для облегчения отбора клеток, которые вероятно содержат интегрированную рекомбинантную ДНК, кодирующую желаемый терапевтический белок, например факторы роста, например IGF-1. Обычно используют устойчивость к антибиотикам или способность расти в селективной питательной среде, подтвержденную с помощью гена, коинтегрированного в трансформирующий вектор (см. Weber, W. and Fussenegger, M. (2003) Inducible gene expression in mammalian cells, in Gene transfer and expression in mammalian cells (Makrides, S.C., Ed.), Elsevier: Amsterdam, p. 589-604) (Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector: Niwa Hitoshi, Yamamura Ken-ichi, Miyazaki Jun-ichi). В двух наиболее распространенных системах экспрессии CHO для продукции рекомбинантного белка используют селекцию, основанную на ингибировании дигидрофолатредуктазы (DHFR) метотрексатом (MTX), или селекцию, основанную на ингибировании глутаминсинтетазы (GS) метионина сульфоксимином (MSX) (Rita Costa A., Elisa Rodrigues M., Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. Eur J Pharm Biopharm. 2010 Feb; 74 (2):127-38. Epub 2009 Oct 22. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production).

Векторы, особенно подходящие для получения полипептидов в клетках млекопитающих, в частности в клетках грызунов, таких как клетки CHO и клетки CHO, дефективные по гену DHFR, описаны в заявке на патент WO09080720A. Существует несколько подходящих методов, известных в данной области техники, для введения вектора экспрессии в клетку-хозяина млекопитающего.

Соответствующие методы включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию с использованием фосфата кальция, электропорацию, липофекцию, биолистический метод переноса генов и перенос генов с использованием полимеров. Подходящие клетки-хозяева описаны выше. После введения вектора экспрессии нуклеиновой кислоты в клетку(и)-хозяина, полученные трансформанты культивируют в селективных условиях, подходящих для определения экспрессии маркерного гена, селективируемого в клетке млекопитающего, заключенного в экспрессионную кассету (MSM). Это означает, что, например, если маркерный ген, селективируемый в клетке млекопитающего, является геном устойчивости к антибиотику, трансформанты культивируют в среде, содержащей соответствующий антибиотик, активный в клетках млекопитающих, и отбирают трансформанты, которые жизнеспособны в таких условиях, таким образом, обеспечивается возможность получения трансформантов, которые экспрессируют маркерный ген и, следовательно, содержат вектор. Кроме того, может быть проведен второй этап отбора путем культивирования трансформантов в селективной среде, адаптированной для отбора способного к амплификации гена селективного маркера, включенного в экспрессионную кассету (MASM). Например, в случае, когда DHFR используют в качестве способного к амплификации селективируемого маркерного гена, трансформанты можно культивировать в среде, не содержащей нуклеотидов или пуринов, в присутствии ингибитора DHFR. В случае использования индуцируемого промотора по меньшей мере в одной экспрессионной кассете соответствующий сигнал индукции должен предоставляться для начала экспрессии полипептида. Чтобы воспользоваться системой селекции/амплификации на основе DHFR, указанные клетки-хозяева можно культивировать в присутствии ингибитора DHFR. Подходящие ингибиторы DHFR представляют собой антифолаты, такие как, например, MTX. Используемая концентрация антифолата/MTX зависит от клетки-хозяина и варианта DHFR, включенного в вектор. Диапазон концентраций может быть выбран для многостадийных процедур амплификации в клетках-хозяевах DHFR, например, со значениями приблизительно 5-20 нМ, доходящими до значений от 500 до 1000 нМ или даже выше для второй и последующих стадий амплификации. Для клеток DHFR⁺ обычно используют более высокие начальные концентрации в диапазоне от 100 до 750 нМ, предпочтительно 500 нМ на первых стадиях, и от 500 до 1000 нМ и выше на последующих стадиях амплификации. Подходящие варианты DHFR описаны выше.

Чтобы воспользоваться системой селекции/амплификации на основе GS, указанные клетки-хозяева можно культивировать в присутствии, например, MSX. Используемая концентрация MSX зависит от клетки-хозяина. Можно выбрать диапазон концентраций приблизительно от 15 до 150 мкмоль, от 20 до 100 мкмоль и от 25 до 50 мкмоль. Указанные диапазоны особенно подходят для клеток NSO и CHO.

Фармацевтические композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, например фармацевтической композиции, содержащей один вариант IGF-1 или комбинацию описанных выше вариантов IGF-1, включенных в состав вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтические композиции по изобретению также можно вводить в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. Например, варианты IGF-1 по настоящему изобретению могут быть объединены по меньшей мере с одним агентом, увеличивающим мышечную силу, например с антителом анти-ActRIIB, IGF-2 или с вариантами IGF-2, с антителом против миостатина, пропептидом миостатина, белком-ловушкой миостатина, который связывает ActRIIB, но не активирует его, агонистом бета-2, агонистом грелина, SARM, агонистами/миметиками GH или фоллистатином. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, описаны более подробно ниже в разделе о видах использования вариантов IGF-1 по изобретению.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата, или указанный в списке в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин "носитель" означает разбавитель, адъювант, наполнитель или носитель, с которым вводят лекарственное средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе получаемые из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, если желательно, также может содержать в незначительных количествах смачивающие или эмульгирующие вещества или pH буферные агенты. Указанные композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть изготовлена в виде суппозитория с общепринятыми связывающими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральные препараты могут включать стандартные носители, имеющие фармацевтическую степень чистоты, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

В предпочтительном варианте осуществления композицию создают согласно общепринятым способам в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. При

необходимости композиция может также содержать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть налита в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Фармацевтически приемлемый носитель включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель должен быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто веществом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтическая композиция по изобретению может также включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают

водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное;

растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и

металлические хелатообразующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрывающих веществ, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Указанные композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как за счет стерилизации, как указано выше, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п., в композиции. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута включением агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть изготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, предназначенной для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Оптимальную текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования сурфактантов. Во многих случаях можно ввести в состав композиции изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например солей моностеарата и желатина. Стерильные инъекционные растворы могут быть изготовлены путем включения требуемого количества активного соединения в соответствующий растворитель с одним агентом или комбинацией агентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие агенты из тех, которые перечислены выше. Что касается стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, способы их изготовления включают вакуумную сушку и сушку сублимацией (лиофилизацию), которые позволяют получить порошок активного вещества плюс любого дополнительного желаемого вещества из их раствора, предва-

рительно стерилизованного фильтрацией.

Количество активного агента, которое можно объединить с веществом-носителем для получения одной дозы лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от индивида, которого лечат, и конкретного способа введения. Количество активного агента, которое можно объединить с веществом-носителем для получения разовой дозы лекарственной формы, как правило, будет составлять такое количество композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из общего числа 100% указанное количество будет варьировать приблизительно от 0,01 до 99% активного вещества, приблизительно от 0,1 до 70% или приблизительно от 1 до 30% активного вещества в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования подбирают для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно ввести один болюс, можно ввести несколько разделенных доз в течение некоторого времени или можно пропорционально уменьшить или увеличить дозу в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно эффективно создавать парентеральные композиции в дозированной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Дозированная лекарственная форма в данном контексте относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для индивидов, которых лечат; каждая единица содержит заранее установленное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация дозированных лекарственных форм по изобретению определяется и непосредственно зависит от уникальных свойств активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который нужно достичь, и от естественных ограничений в области приготовления смесей, таких как чувствительность к такому активному соединению при лечении индивидов.

Терапевтически эффективное количество полипептида в контексте введения вариантов IGF-1 по изобретению или композиции, содержащей указанные варианты IGF-1, изменяется в диапазоне приблизительно от 0,001 до 100 мг/кг, или от 0,01 до 30 мг/кг и чаще от 0,1 до 10 мг/кг массы тела. Например, дозы могут составлять приблизительно 0,1 мг/кг массы тела, приблизительно 0,2 мг/кг массы тела, приблизительно 0,3 мг/кг массы тела, приблизительно 1 мг/кг массы тела, приблизительно 3 мг/кг массы тела, приблизительно 5 мг/кг массы тела или приблизительно 10 мг/кг массы тела. Специалисту известно, как определить подходящую эффективную дозу, которая будет отличаться в зависимости от способа введения (например, внутривенно или подкожно). Примерная схема лечения включает введение один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз каждые четыре недели или один раз в месяц. Такое введение можно осуществить внутривенно или подкожно. Режимы дозирования вариантов IGF-1 по изобретению включают 0,1 мг/кг массы тела, или 0,2 мг/кг массы тела, или 0,3 мг/кг массы тела, или 0,5 мг/кг массы тела, или 1 мг/кг массы тела, или 3 мг/кг массы тела, или 10 мг/кг массы тела для внутривенного введения. Альтернативно, композиция может представлять собой состав с замедленным высвобождением, в таком случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота изменяются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. Дозировка и частота введения могут меняться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении относительно низкую дозу вводят через относительно редкие интервалы в течение продолжительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей остальной жизни. При терапевтическом применении в ряде случаев требуется введение относительно высокой дозы через относительно короткие интервалы до тех пор, пока не уменьшится или не прекратится прогрессирование заболевания, или до тех пор, пока у пациента не наступит полное или частичное уменьшение симптомов заболевания. Затем пациент может получать препарат в профилактическом режиме. Фактические уровни доз активных агентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять так, чтобы применять количество активного агента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсического воздействия на пациента. Выбранный уровень доз зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного соединения, которое применяют, продолжительность лечения, другие препараты, соединения и/или вещества, используемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и анамнез пациента, получающего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Введение терапевтически эффективной дозы варианта IGF-1, содержащегося в композициях по изобретению, может привести к снижению выраженности симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или к предотвращению ухудшения состояния или инвалидности вследствие болезни, т.е. может привести к увеличению мышечной массы и/или функции или к уменьшению/восстановлению области поражения у ожоговых больных.

Пациенты получают эффективное количество полипептида активного ингредиента, т.е. количество, достаточное для обнаружения, лечения, облегчения или профилактики заболевания или расстройства, о котором идет речь. Терапевтические эффекты также могут включать в себя уменьшение физических

симптомов. Оптимальное эффективное количество и концентрация терапевтического белка для любого конкретного индивида зависят от различных факторов, в том числе от состояния здоровья, размеров, возраста и/или пола пациента, характера и степени выраженности патологического состояния, активности конкретного терапевтического белка, скорости его выведения из организма, а также от какого-либо возможного дополнительного лекарства(в), вводимого в комбинации с терапевтическим белком. Эффективное количество, доставляемое в конкретной ситуации, можно определить с помощью стандартных экспериментов, и его определение находится в компетенции врача. Дозирование может осуществляться с помощью режима однократных инъекций или режима многократных инъекций.

Композицию по настоящему изобретению можно ввести одним или несколькими путями с использованием одного или более из множества способов, известных в данной области. Специалисту в данной области известно, что путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Пути введения терапевтических белков по изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение" в настоящем контексте означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В одном варианте осуществления композицию, содержащую антитело, вводят внутривенно. В другом варианте осуществления антитело вводят подкожно.

Альтернативно композицию, содержащую вариант IGF-1 по изобретению, можно вводить не парентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в виде препаратов с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких препаратов запатентованы или в целом известны специалистам в данной области; см., например, "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, в одном варианте осуществления терапевтическую композицию по изобретению можно ввести с помощью безыгольного гиподермального инъектора, такого как устройства, описанные в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, используемых в настоящем изобретении, включают патент США № 4487603, в котором показана имплантируемая микроинфузионная помпа для подачи лекарства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором показано терапевтическое устройство для введения лекарств через кожу; патент США № 4447233, в котором показана инфузионная помпа для подачи лекарства с точной скоростью введения; патент США № 4447224, в котором показана имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для непрерывной доставки лекарства; патент США № 4439196, в котором показана осмотическая система доставки лекарств, имеющая многокамерные отделения; и патент США № 4475196, в котором показана осмотическая система доставки лекарств. Многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в данной области, и они включают имплантаты, системы доставки и модули, производимые компанией MicroCHIPSTM (Bedford, MA).

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая человеческий вариант IGF-1 по изобретению, может быть разработана для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) непроницаем для многих высокогидрофильных соединений. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения по изобретению проходят через BBB (при необходимости), они могут быть заключены, например, в липосомы. В отношении способов получения липосом см., например, патенты США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько функциональных групп, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы и, следовательно, увеличивают направленную доставку лекарства (см., например, V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol. 29:685). Типичные адресно-взаимодействующие функциональные группы включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016); маннозиды (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); поверхностный рецептор протеина A (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Целевые заболевания и состояния.

Изобретение предлагает полипептид, нуклеиновую кислоту или фармацевтическую композицию по

изобретению для использования в терапии. Кроме того, изобретение предлагает полипептид, нуклеиновую кислоту или фармацевтическую композицию по изобретению для использования в лечении патологического состояния. Изобретение дополнительно предлагает использование полипептида, нуклеиновой кислоты или фармацевтической композиции по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения патологического состояния. Изобретение дополнительно предлагает способ лечения пациента, имеющего патологическое состояние, способ включает введение терапевтически эффективного количества полипептида, нуклеиновой кислоты или фармацевтической композиции по настоящему изобретению указанному пациенту.

Патологическое нарушение может представлять собой заболевание костно-мышечной системы или нарушение, такое как мышечная атрофия. Существует много причин мышечной атрофии, в том числе в результате лечения глюкокортикоидом, таким как кортизол, дексаметазон, бетаметазон, преднизон, метилпреднизолон или преднизолон. Мышечная дистрофия также может быть результатом денервации вследствие травмы нерва или результатом дегенеративной, метаболической или воспалительной нейропатии (например, синдром Гийена-Барре, периферическая нейропатия или воздействие токсинов окружающей среды или лекарств).

Кроме того, мышечная атрофия может быть результатом миопатии, такой как миотония; врожденная миопатия, включая немалиновую миопатию, мульти/миниядерную миопатию и миотубулярную (центронуклеарную) миопатию; митохондриальная миопатия; семейный периодический паралич; воспалительная миопатия; метаболическая миопатия, например, обусловленная болезнью накопления липидов или гликогена; дерматомиозит; полимиозит; миозит с включенными тельцами; оссифицирующий миозит; рабдомиолиз и миоглобинурия.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована для лечения болезни Кеннеди или хронического заболевания почек.

Миопатия может быть вызвана синдромом мышечной дистрофии, таким как синдром Дюшенна, синдром Беккера, миотонический синдром, лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия, синдром Эмери-Дрейфуса, окулофарингеальная дистрофия, плечелопаточная миопатия, конечностно-поясная мышечная дистрофия, синдром Фукуямы, врожденная мышечная дистрофия или наследственная дистальная миопатия. Мышечно-скелетное заболевание также может представлять собой остеопороз, перелом кости, низкорослость или карликовость.

Кроме того, мышечная атрофия может быть результатом болезни двигательного нейрона у взрослых, такой как боковой амиотрофический склероз; детской спинальной мышечной атрофии, юношеской спинальной мышечной атрофии, мультифокальной моторной невропатии с блоками проведения, паралича в результате инсульта или травмы спинного мозга, скелетной иммобилизации из-за травмы, длительного постельного режима, добровольной гиподинамии, метаболического стресса или недостаточности питания, рака, СПИДа, голодания, нарушения щитовидной железы или надпочечников или гипопиза, диабета, доброкачественной врожденной гипотонии, болезни центральных волокон, заболеваний печени (таких как фиброз, цирроз), сепсиса, почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, старения, космического полета или времени, проведенного в невесомости.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может быть использована для лечения пациентов с ожогами, включая взрослых и детей с ожогами, страдающих от потери безжировой массы тела и/или мышечного истощения.

Примеры возрастных состояний, которые можно лечить, включают саркопению, атрофию кожи, атрофию мышц, атрофию головного мозга, атеросклероз, артериосклероз, эмфизему легких, остеопороз, остеоартрит, иммунологическую некомпетентность, гипертонию, слабоумие, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, катаракту, возрастную макулярную дегенерацию, рак предстательной железы, инсульт, снижение продолжительности жизни, слабость, потерю памяти, морщины, снижение функции почек, возрастную потерю слуха; нарушения обмена веществ, в том числе диабет типа II, метаболический синдром, гипергликемию и ожирение.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция по изобретению может быть использована для лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (COPD). В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция по изобретению может быть использована для лечения мышечной атрофии. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к применению фармацевтической композиции по изобретению для лечения мышечной атрофии, где атрофия выбрана из группы, состоящей из саркопении, связанной с ожирением, саркопении и мышечной атрофии, связанной с диабетом.

Другие состояния, которые можно лечить, включают острое и/или хроническое заболевание почек или недостаточность, фиброз или цирроз печени, рак, например рак поджелудочной железы, рак желудочно-кишечного тракта (включая рак пищевода, желудка и кишечника), рак легких, рак предстательной железы, лимфому или рак молочной железы; болезнь Паркинсона; состояния, связанные с гибелью нейронов, такие как ALS (амиотрофический боковой склероз), атрофию мозга или деменцию, и анемию; хронические инфекции, такие как туберкулез, вызванные либо микобактерией туберкулеза, либо атипичными микобактериями; хронические грибковые инфекции; и оппортунистические инфекции на фоне по-

давления иммунитета, либо ятрогенного, либо вследствие AIDS.

Другие состояния включают кахексию, кахексию, связанную с ревматоидным артритом, и кахексию, связанную с раком.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения мышечного расстройства, способ включает введение терапевтически эффективного количества, как описано выше, полипептидов по изобретению. Необходимость лечения описанными полипептидами или композициями, содержащими их, с целью увеличения мышечной массы может быть следствием одного из указанных выше состояний, в частности следствием мышечно-скелетного заболевания или нарушения, такого как мышечная атрофия, где мышечное расстройство представляет собой мышечную атрофию, выбранную из группы, состоящей из саркопении, связанной с ожирением, саркопении и мышечной атрофии, связанной с диабетом.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения ожога, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), состояния, связанного с возрастом, например саркопении, болезни Кеннеди или хронического заболевания почек, способ включает введение терапевтически эффективного количества пациенту, как описано выше, полипептидов по изобретению.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу увеличения мышечной массы. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу увеличения мышечной массы у пациента, который в этом нуждается. Необходимость увеличения мышечной массы может возникать вследствие одного из указанных выше состояний, в частности следствием мышечно-скелетного заболевания или нарушения, такого как мышечная атрофия. Необходимость увеличения мышечной массы также может возникать вследствие ожога, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), состояния, связанного с возрастом, например саркопении, болезни Кеннеди или хронического заболевания почек.

Введение композиции пациенту.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить пациенту. Введение обычно осуществляют с помощью шприца. Таким образом, изобретение предлагает устройство для доставки (например, шприц), содержащее фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

Известны различные системы доставки, и они могут быть использованы для введения полипептида согласно изобретению, например заключение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать белок, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, J Biol Chem, 262:4429-4432, 1987), конструкция нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного, аденоассоциированного вирусного, аденовирусного, поксвирусного (например, авипоксвирусного, в особенности поксвируса домашних птиц) или другого вектора и т.д. Способы введения могут быть энтеральными или парентеральными, и они включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, легочный, внутриглазной, эпидуральный и пероральный пути введения. Полипептиды можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистая оболочка полости рта, слизистая оболочка прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение фармацевтических композиций по изобретению в центральную нервную систему любым подходящим способом, включая внутривенную и интратекальную инъекцию; осуществление внутривенной инъекции можно упростить с помощью внутривенного катетера, например, соединенного с резервуаром, таким как резервуар Оммайя. В конкретном варианте осуществления может быть желательно введение фармацевтических композиций по изобретению локально в область, нуждающуюся в лечении; это можно осуществить, например, и без ограничения, с помощью местной инфузии во время операции, местного нанесения, например, с помощью инъекции, с помощью катетера или с помощью импланта, имплант состоит из пористого, непористого или гелеобразного вещества, включая мембраны, такие как силиконовые мембраны, волокна или коммерческие заменители кожи.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть доставлена в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer, Science 249:1527-1533, 1990). В другом варианте осуществления активный агент может быть доставлен в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может быть использована помпа.

Группы пациентов.

Пациенты, которым может быть полезно предлагаемое лечение, включают пациентов, восстанавливающихся после острого или критического заболевания, требующего интенсивной терапии или длительной госпитализации (свыше 1 недели); ослабленных пожилых пациентов с саркопенией; молодых людей, выздоравливающих после тяжелой травмы, такой как автомобильные травмы, тяжелые ожоги, боевые ранения и другие травматические повреждения; пациентов с хроническими заболеваниями, которые вызывают кахексию, как указано выше; и пациентов с заболеваниями мышц, как указано выше. Поскольку потеря мышц является общим осложнением большинства заболеваний, которые являются либо тяжелыми, либо продолжительными, предполагается, что купирование мышечной атрофии будет ускорять вос-

становление и возвращение функций у пациентов, которые испытывают атрофию мышечной ткани, независимо от причины указанной атрофии.

Комбинированная терапия.

Это лечение можно сочетать с любым лечением, назначенным в связи с основной причиной процесса мышечной атрофии. Такие комбинации могут включать в себя кортикостероиды, иммуносупрессивные агенты, антицитокиновые агенты, противоопухолевые лекарства; факторы роста, такие как эритропоэтин, G-CSF, GM-CSF, или другие; лекарственные средства, используемые для лечения диабета (в том числе инсулин и пероральные гипогликемические средства), противотуберкулезные препараты и антибиотики. Комбинации могут включать как небольшие молекулы, так и биомолекулярные агенты.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в качестве единственного активного агента или в комбинации, например в качестве адьюванта, с другими лекарственными средствами, например с антителом ActRIIB, антителом ActRIIA, с растворимым миметиком-"ловушкой" ActRIIB, с антителом против миостатина, с пропептидом миостатина, с белком-"ловушкой" для миостатина, который связывает ActRIIB, но не активирует его, с бета-2-агонистом, с агонистом грелина, с SARM, с агонистами/миметиками GH или с фоллестатином. Например, лекарственное средство по изобретению можно применять в комбинации с антителом ActRIIB, как описано в WO2010125003.

Последовательности

SEQ ID NO:	ДНК/Белок	Описание	Последовательность
1	Белок	hIGF-1 без лидерной последовательности	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSA
2	Белок	Еа-пептид	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM
3	Белок	Еb-пептид	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRRFEGSRNAFCRGKKGK
4	Белок	Ес-пептид	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNKTSQRRKGSTFEERK
5	Белок	IGF-1-Ea дикого типа без лидерной последовательности	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRM
6	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-7c-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-7c-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYRMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	Белок	hIGF1-Ea- Fc_mut 13/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	Белок	hIGF1-Ea- Fc_mut 13/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSGAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	Белок	hIGF1-Ea- Fc_mut 13/2_C	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	Белок	hIGF1-Ea- Fc_mut 13/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHGDWLNQKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

12	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTPPCPAPEAAAGGSPVFLFPKPKD PKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH LHQDWLNKEYKCKVSNKALPAIEKTKSAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKLG FYPSDIAVEWESNGQFENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
13	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYQMDKTHTPPCPAPEAAAGGSPVFLFPKPKD PKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH LHQDWLNKEYKCKVSNKALPAIEKTKSAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQFENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYH TQKSLSLSPGK
14	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSKTHTPPCPAPEAAAGGSPVFLFPKPKDITLMSRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHLDWLNKEY YKCKVSNKALPAIEKTKSAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQFENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKSLSL SPGK
15	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	acgctctcgagggtgagctggtgagctctcagtcctgtgtggagacaggggctttattcaacaagcccaagggtatggctc cagcagtcaggcggcgctcagacagcatcgtgtagtgctctccgagctgtgatdaaggaggctggagatgattgctg caccctcaagctgcgtccgagccagcagcacccgacatgcccaagaccagaaggaagtaacattgaagaaagcgaagt agaggagtgtaggaaacaagaactacacagatggacaaaacacacatgccaccgtgccagacactgaagcagcggg ggacccgtcagctctctcccccacaacccaaggacacccatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtgtgtggag gtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtagcggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagcccgga ggagcagtgacaacagcagcagtaaccgggtggtcagcgtctcaccgtctgacacaggaactggctgaatggcaggaagtacagtg caaggtgtccaaacaagcctccagccccatcgagaaaaacatctccaaagccaagggcagccccgagccccgagaaacaggtg aacccctgccccactccgggagggagatgacacagaacacaggtcagcctgacctgctggtgcaaaagctctatccacagcagcat cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaacactacaagacacgcctccgtgctggagctccgagcgtctctctc ctctacagcagctcacgtgggacagagcaggtggcagcaggggaaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaaa ccactacacgcagaaagacctctccctgctccgggtaaa
16	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	acgctctcgagggtgagctggtgagctctcagtcctgtgtggagacaggggctttattcaacaagcccaagggtatggctc cagcagtcaggcggcgctcagacagcatcgtgtagtgctctccgagctgtgatdaaggaggctggagatgattgctg caccctcaagctgcgtccgagccagcagcacccgacatgcccaagaccagaaggaagtaacattgaagaaagcgaagt agaggagtgtaggaaacaagaactacacagatgtgtccacgtgcccagcacctgaagcagcgggggagacgtcagctctctc ctccccccaacaaggaacacccatgatctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtggagcgtgagccaagagac ctgaggtcaagttcaactgtcagtgacggcgtggtggaggtgataatgccaagacaagccgaggagagcagtaacacag cagctacccgtgtgtagcgtctcaccgtctgcacacaggaactggctgaatggcaaggagtaacagtgcaaggtcctccaca ggcctccagccccatcgagaaaaacacatctccaaagccaagggcagccccgagaaacacaggtgtacatccgtcccccactc ccgggaggagatgaccaaagacacaggtcagcctgacctgctggtcaaaagctctctacccagcagcatccgctgagtggtga gagcaatgggcagccggagaaacaactacaagacacgcctccgtgctggagctcgaacggctctctctctacagcagctca ccgtggacaagagcagtggtgagcaggggaaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaacacacacagcaga gagctctccctctccgggtaaa
17	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	acgctctcgagggtgagctggtgagctctcagtcctgtgtggagacaggggctttattcaacaagcccaagggtatggctc cagcagtcaggcggcgctcagacagcatcgtgtagtgctctccgagctgtgatdaaggaggctggagatgattgctg caccctcaagctgcgtccgagccagcagcacccgacatgcccaagaccagaaggaagtaacattgaagaaagcgaagt gggtgtccacgtgcccagcacctgaagcagcgggggagacgtcagctctctccccccaacaacccaaggaacacccatcaga tctccggacccctgaggtcacatgcgtgtgtgtggagtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactgtgtagtggaacgc gtgtaggtgataatgccaagacaagccgggagggagcagtaacacagcagctaccgggtgtgtagcgtctccacgtctc caccaggaactgtagatggcaaggagtaacagtgcaaggtctccacaacaaagccctccagccccatcgagaaacacatctc aaagccaaagggcagccccgagaaacacaggtgtacacccctgccccatccgggagagatgacaaagacacaggtcagc ctgacctgctgtgcaaaaggctctatccagcagacatccgtgtagtggtgagagcaatgggcagccgggagaaacaactacaag accaacgctccgtgtagcctcgaacgctcctctctctacagcaagctcaccgtggaacaagcaggtggcagcaggggga acgtctctcatgctccgtgtagtgatgaggctctgcaacaacacactacacgcagaaagagcctctccgtctccgggtaaa
18	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	acgctctcgagggtgagctggtgagctctcagtcctgtgtggagacaggggctttattcaacaagcccaagggtatggctc cagcagtcaggcggcgctcagacagcatcgtgtagtgctctccgagctgtgatdaaggaggctggagatgattgctg caccctcaagctgcgtccgagccagcagcacccgacatgcccaagaccagaaggaagtaacattgaagaaagcgaagt gggagacaacactatgatctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtggagcgtgacgaagacagacacccctgaggtca aaggaacacccctatgatctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtggagcgtgacgaagacagacacccctgaggtca actgttagctgtgagcggcgtggaggtgataatgccaagacaagccgggagggagcagtaacacagcagtcacgggtgtgct agcgtctcaacgtctgcacccaggaactggtgaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctccacaacaagccctccagccccca tcgagaaacacactccacaagccaaagggcagccccgagaaacacaggtgtacacccctgccccatccgggagggagatgac caagaacacaggtcagcctgacctgctgtcaaaaggctctatccagcagacatcgccgtgagtgaggagacgaatgggcagcc ggagaaacaactacaagacacgcctccgtgctggactcgaacggctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagca ggtggcagcagggggaacgtctctcatgctccgtgtagtgatgaggctctgcaacaacacacacgcagaaagacccctctctc cggtgaaa
19	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	acgctctcgagggtgagctggtgagctctcagtcctgtgtggagacaggggctttattcaacaagcccaagggtatggctc cagcagtcaggaggcggcctcagacagcatcgtgtagtgctctccgagctgtgatdaaggaggctggagatgattgctg caccctcaagctgcgtccgagccagcagcacccgacatgcccaagaccagaaggaagtaacattgaagaaagcgaagt agaggagtgtaggaaacaagaactacacagatggacaaaacacacatgccaccgtgccagacactgaagcagcggg ggacccgtcagctctctcccccacaacccaaggacacccatgatctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtggag gtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactgtgtagcggacggcgtggaggtgataatgccaagacaagcccgga ggagcagtgacaacagcagtcacgggtgtgtagcgtctcaccgtctgacacaggaactggctgaatggcagagaagatgaca caaggtgtccacaagaacccctccagcccccatcgagaaaaacatctccaaagccaagggcagccccgagaaacacaggtg aacccctgccccactccgggagggagatgacacagaacacaggtcagcctgacctgctggtgcaaaagctctatccacagcagat cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaacactacaagacacgcctccgtgctggagctccgagcgtctctctc ctctacagcagctcacgtgggacaagagcaggtggcagcaggggaaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaaa ccactacacgcagaaagacctctccctgctccgggtaaa

20	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	acgctctgcggggctgagctgggtgctcttcagttcgtggtgagacaggggctttattcaacaagccacagggatggtctcagcagtcgggagggcgctcagacaaagcatcgtggtgatggtgcttcggagctgtgatcaaggaggctggagatgattgcgaccccccaagcctgctccagggccagcagcacaacgacatgcccgaagccagaaggaagtaatttgaagacgcgaagt agagggaagtcagagaaacaagaadtaccagatgtgccacggcgccagcaccctgaagcagcgggggagcctgagttctctcttcccccaaaacccaaggacacccatgatctccggacccctgaggtcactgctggtggtgagcagcgaagac cctgaggtcaagttcaadggtacgtggacggtggtggtgataalgccaagcaaaagccgggaggaagcagtaacaacacagctaccgggggtgcagcgctctcagctcagcaccaggaactggaatggcaaggagtaacagtgcaaggtctccaacaa ggcctccagcggccatcgagaaaaaccatctccaagcacaagggcagccccgagaaaccaaggggtgacacccgtccccatc cgggagggagatgaccaaagaaacaggtcagcctgacgtgctggtcaaaagctctctatccagcgacatcgcggtgagtgga gaggcaatgggagcagcgagaaacaactacaagaccacgctcccgctggtgagctcgaagcgtctctctctacagcaagctca cgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaacactacacgagaa gagctctccctgctccgggtaaa
21	ДНК	hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	acgctctgcggggctgagctgggtgctcttcagttcgtggtgagacaggggctttattcaacaagccacagggatggtctcagcagtcgggagggcgctcagacaaagcatcgtggtgatggtgcttcggagctgtgatcaaggaggctggagatgattgcgaccccccaagcctgctccagggccagcagcacaacgacatgcccgaagccagaaggaagtaatttgaagacgcgaagt ggggacaaaadtacacatgcccacgtgcccagcacctgaagcagcggggggagcgtgagttctctctcccccaaaaccca aaggacacccctcatgctccggacccctgaggtcactgctggtggtgagcgtgagccagaaagacccctgaggtcaagttca adggtacgtggagcgggtggtggtggtgataatgccaagcaaaagcggcgaggaggagcagtaacaacagcagtaacgggtgtc agcgtctcaccgtcctgaccaggaactggtgatggtgcaaggtacaaaggtcgaaggtctccaaacaagccctccagccccca tcgagaaaaccatctccaagccaagggcagccccgagaaaccaaggtgtacacccctccccatccgggagggagatgac caagaacacaggtcagcgtgacgtgctggtcaaaagctctatccagcgacatcgcggtgagtggtgagagcaatgggagcc ggagacaactacaagaacacgctcccggtggtgactccgagcgtctctctctacagcaagctcaccgtggacaaagagca ggtggcagaggggaaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaacactacacgagaaagcctctccgtctc cgggtaaa
22	Белок	шарнир 1	CPPCPA
23	Белок	шарнир 2	DKTHTCPPCPA
24	Белок	шарнир 3	EPKSCDKTHTCPPCPA
25	Белок	измененный Ea-пептид 1	VQAQQTDMPKTQKEVHLKNASG
26	Белок	измененный E-пептид	VQAQQTDMPKTQKYQPPATNKNKTSQRRKGS
27	Белок	hlgF1-Ea-mut 03	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAP LKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
28	ДНК	hlgF1-Ea-mut 03	ggacgcagctcctgcggggctgagctgggtggtgctcttcagttcgtggtgagacaggggctttattcaacaagccacagggat atggtccagcagtcgggctgacgacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agtattgogcaccctcaagcctgccaagtacgtctcgtgcccagcgccacacgacatgcccagaagccaggaaggaatgacatt gaagacgcagcagtagaggggagtgaggaaacaagaactacaggatg
29	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 02	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYQMGSDKTHTCPPEAAGGSPV FLFPKPKDITLMISRTPVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHODVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 04	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYQMGSDKTHTCPPEAAGGSPV FLFPKPKDITLMISRTPVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHODVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	Белок	hlgF1-Ea-Fc_mut 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYQMGSDKTHTCPPEAAGGSPV FLFPKPKDITLMISRTPVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHODVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	Белок	Пример 8	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
33	Белок	Пример 9	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
34	Белок	Пример 10	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
35	Белок	Пример 11	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
36	Белок	Пример 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
37	Белок	Пример 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
38	Белок	Пример 14	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
39	Белок	Пример 15	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM
40	Белок	Пример 16	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnkNYRM

[illegible]

72	Белок	Пример 48	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
73	Белок	Пример 49	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyrm
74	Белок	Пример 50	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyrm
75	Белок	Пример 51	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyrm
76	Белок	Пример 52	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
77	Белок	Пример 53	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
78	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
79	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTAIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
80	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
81	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
82	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
83	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
84	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
85	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
86	Белок	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q - fc-домен	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyqm
87	Белок	hIGF1-Ea (delGPE, R37A)	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAgnknyrm
88	ДНК	hIGF1-Ea-hFc_mut2 прямой праймер	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
89	ДНК	hIGF1-Ea-hFc_mut2 обратный праймер	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGCTGAGGCGCCGCC
90	ДНК	hIGF1-Ea-hFc_mut3 прямой праймер	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
91	ДНК	hIGF1-Ea-hFc_mut3 обратный праймер	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGCTGAGGCGCCGCC

92	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut4 прямой праймер	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
93	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut4 обратный праймер	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNCCGACTGCTGGAGCCATACCCCTGTGG
94	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut12 прямой праймер	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
95	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut12 обратный праймер	TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCCTGTGGGC
96	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut13 прямой праймер	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
97	ДНК	hGF1-Ea-hFc_mut13 обратный праймер	TGTCTGAGGCGCCCGCTGACTGCTGGAGCCATACCCCTGTGG
98	ДНК	G42 праймер мутации	CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG
99	ДНК	клетки, производные СНОК1, клон 1: копия Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGCACCTACAG(Δagttag)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
100	ДНК	нокаутные клетки, производные СНОК1, клон 2: копия Δ5	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGCACCTACAG(Δagttag)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
101	ДНК	нокаутные клетки, производные СНОК1, клон 3: копия Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGCACCTACAG(Δagttag)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
102	ДНК	нокаутные клетки, производные СНОК1, клон 2: копия Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGC(Δacctacaggttcgagggctggc)GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
103	ДНК	нокаутные клетки, производные СНОК1, клон 1: копия 14 нуклеотидов заменены и 18 добавлены	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGTgaggtataggacagtattatagaggtgggcAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
104	ДНК	нокаутные клетки, производные СНОК1, клон 3: копия Δ114	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGCACCAGGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
105	ДНК	нокаутные клетки, производные СНО-DUXB11, клон: последовательность Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGC(Δacctacaggttcgagggctggc)GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
106	ДНК	нокаутные клетки, производные СНО-DUXB11, клон: последовательность Δ7	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCCTGCCACCTGGCACCTACA(Δggtttag)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCACTGGCTCTTTGTTCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCAACCCAGAGGTTTCATCCAG
107	ДНК	СНО IGF 1R сайты узнавания нуклеазы "цинковые пальцы" и сайты разрезания	CCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGG

108	ДНК	СНО IGF 1R прямой праймер для секвенирования (в интроне 2-3)	CTAGCCTGTCTCTGGGACAC
109	ДНК	СНО IGF 1R обратный праймер для секвенирования (в интроне 3-4)	CTGGATGAACCTCTGGGTGG
110	ДНК	СНО IGF 1R экзон 3	TGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCGAGAACCAACGAATGCTGCCACCCA GAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAAACACACCTGTGTGGCCCTGCCGACA CTACTACTACAAAGCGGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGCGACCTACAGGT/TCGAGG GCTGCGCGTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGAC TCAGATGGCTTTGTCTATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATC CGCAACAGCACCCAGAG
111	ДНК	СНО IGF 1R экзон 3 и фланкирующие интроны	AAACTTAACGGGCACATCCCATAGCAAAACCATTTTCATAAGAAAGGAGTTGGCATGTGTTGTG TCCTTTCCAGTGTGGGCTTCACAGATGGTATTACCTGTGCAGATTTTCAGAGAAAGTGTGT TTTTCTAGCCTGTCTCTGGGACACCATTTAGTGTGTTGTGGCAGCAGATGACCTGG GGAGGCTGTGTAGTCTCTTCTATCTCACCACCTCCTCCCTGTTCACCAAGTGTGCCAA GTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCGAGAACCAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTA GGCAGCTGCCATACACCTGACGACAAACACACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTAC AAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCACCTGGCAGCTACAGGT/TCGAGGCTGGCCT GTGTGGACCGGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGC TTTGTCTATCCAGTGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGC ACCCAGAGGTCAGTGGCTTTGTTCCCTCAGGAGGTGAATCTTTGTCATATTCATGA TTGAGGAACCCAGAGGTTTCATCCAGATGGGAGGCTGTTTGGAGGCTGCTGACTAA GCTGTTTATGAGAATCTTGAATGGCTGGTCTGTTTCTTTGTTTGTGGCTTGTCT TTGTTGCTTTGAAAGTGCCTTGTAGCCCTAGAGAGGAAGAATTAGCCTGTCTG
112	ДНК	последовательность Козака	CCCGCCGCCACC
113	Белок	hIGF1-Ea- del1-3, R37A, del1-72, R74Q, R77Q, R104Q-1c	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLRMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNNHYTKSLSLSPGK
114	Белок	hIGF1-Ea- hFc_mu103	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLRMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNNHYTKSLSLSPGK
115	Белок	измененный Еа-пептид	VQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGAGNKNYQM
116	Белок	hIGF1-Ea- hFc_mut 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLRMYCAPLK PAKSAVQAQQTDMPKTQKEVHLKNASRGAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNNHYTKSLSLSPGK
117	Белок	IGF-1 (G42S)	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLRMYCA PLKPAKSA
118	Белок	hIGF1-Ea-mut 03-G42S	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLRMYCAP LKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGAGNKNYRM

Способы осуществления изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение было описано исключительно для примера, и могут быть проведены модификации, не нарушающие объема и сущности изобретения.

Примеры

Описанные в настоящем документе рекомбинантные варианты IGF-1 имеют аффинность к рецептору, как у белка дикого типа (фиг. 1), но демонстрируют лучший фармакокинетический профиль *in vivo*, чем IGF-1 дикого типа (фиг. 7), и могут использоваться для профилактики мышечной атрофии с меньшей частотой дозирования (фиг. 8). В отличие от некоторых вариантов IGF-1, которые стимулируют фосфорилирование инсулинового рецептора (InsR), приводящее к риску развития гипогликемии, описанные человеческие белки-предшественники IGF-1, которые изменены в положении G42 (делеция или специфические замены), демонстрируют способность стимулировать фосфорилирование инсулинового рецептора (InsR), как белки дикого типа, что снижает указанный риск гипогликемии (фиг. 5/6/19). Кроме того, в отличие от hIGF-1 дикого типа или некоторых вариантов предшествующего уровня техники, описанные в настоящем документе варианты IGF-1 могут быть получены в высоких титрах и без разрушения в клеточных системах млекопитающих, что позволяет производить их в промышленном масштабе.

Часть А. Общая методология.

A1. Реагенты.

Рекомбинантный человеческий IGF-1 приобретали в Novartis AG и рекомбинантный инсулин человека приобретали в Promocell (#C-060212).

A2. Конструирование вектора.

Возможно несколько вариантов сборки вектора в соответствии с принципами настоящего изобретения. Поскольку отдельные элементы вектора известны в предшествующем уровне техники, подходящие векторы можно составить, например, путем секвенирования или амплификации и соответствующего клонирования простых генетических элементов и экспрессионных кассет в требуемом порядке. Соответствующие методы клонирования известны из уровня техники, и также последовательность генетических элементов, указанных выше, описана в предшествующем уровне техники. Соответственно создание век-

торных конструкций описано в качестве примера. Однако специалистам в данной области понятно, что некоторые другие варианты осуществления и пути получения соответствующих векторов применимы и общедоступны. Все векторы экспрессии млекопитающих (например, pBW679), описанные в данном разделе, основаны на векторах экспрессии млекопитающих, описанных в WO2009080720. Раздел "Примеры" в WO2009080720, в особенности фиг. 1, табл. 1 и раздел "Примеры II: векторные конструкции" (с. 21-31) включены в описание посредством ссылки.

Синтез de novo hIGF1-Ea-delGPE-R37A) (SEQ ID NO:87) проводили в компании The Blue Heron Biotech с фланкированием последовательностью Козака по 5'-концу (CCCGCCCCGCCACC) (SEQ ID NO:112) и сайты рестрикции 5'HindIII/BamHI и 3'EcoRI доставляли в векторе Blue Heron pUC. Реклонирование в векторе pcDNA3.1 (Invitrogen, Life Technologies) завершали реакцией лигирования с совместимыми сайтами клонирования 5'BamHI и 3'EcoRI. Последовательность конструкции полностью контролировали с использованием специфических праймеров T7 и BGHA. Затем осуществляли сайт-направленный мутагенез (с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза Quick Change II, Stratagene) полученной ранее конструкции hIGF1-Ea-delGPE-R37A/pCDNA3.1 с удалением двух остатков R71 и S72. Полученную конструкцию hIGF1-Ea-delGPE-R37A-delRS использовали для реклонирования hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS) в вектор экспрессии млекопитающих pRS5a (патентованный вектор Novartis, NPL000961). pRS5a представляет собой вектор экспрессии млекопитающих под контролем CMV-промотора, содержащий сайт полиаденилирования гена BGH (гормон роста быка) и ген устойчивости к ампициллину. hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)/pRS5a архивировали как NPL009759 (запатентованный вектор Novartis).

hIGF1-Ea (del GPE, R37A, del RS) амплифицировали из NPL009759. ПЦР-продукт расщепляли с помощью 5'HindIII/3'BamHI и клонировали в вектор pRS5a-hIgG1 LALA (NPL012935, патентованный вектор Novartis). Осуществляли несколько раундов сайт-направленного мутагенеза, как описано выше, для доставки плазмиды, содержащей hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)-[R74Q-R78Q-R104Q] (NPL017580, патентованный вектор Novartis). Указанную плазмиду использовали в качестве основы для последующего клонирования, описанного ниже.

Плазмида hIGF1-Ea-hFc_mut2.

ПЦР-фрагмент, который содержит мутации G42S, амплифицировали из NPL017580 с использованием мутагенных олигонуклеотидов (5' TGACASTATAGAATAACATCCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:88) и (5' TCACAGTCCCGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGTCTGAGGCGCCGCC 3') (SEQ ID NO:89). Сайты рестрикции эндонуклеазами BlnI и BspEI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента обратно в NPL017580.

Плазмида hIGF1-Ea-hFc_mut3.

ПЦР-фрагмент, который содержит мутации G42P, амплифицировали из NPL017580 с использованием мутагенных олигонуклеотидов (5' TGACASTATAGAATAACATCCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:90) и (5' TCACAGTCCCGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCC 3') (SEQ ID NO:91). Сайты рестрикции эндонуклеазами использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента обратно в NPL017580.

Плазмида hIGF1-Ea-hFc_mut4. ПЦР-фрагмент, который содержит мутацию A37E, амплифицировали из NPL017580 с использованием мутагенных олигонуклеотидов (5' TGACASTATAGAATAACATCCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:92) и (5' TCACAGTCCCGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGMNNCCGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG) (SEQ ID NO:93). Кодон, допускающий неоднозначное соответствие, указан в номенклатуре ИЮПАК, где М обозначает основания А или С и N обозначает основания А, С, G или Т. Последний из двух указанных олигонуклеотидов будет нести кодон, допускающий неоднозначное соответствие, для положения 37. Сайты рестрикции эндонуклеазами BlnI и BspEI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента обратно в NPL017580. Последовательность, содержащую замену в положении A37E, выбирали методом секвенирования.

Плазмида hIGF1-Ea-hFc mut12.

ПЦР-фрагмент, который содержит мутацию R36A-A37R, амплифицировали из NPL017580 с использованием мутагенных олигонуклеотидов (5' TGACASTATAGAATAACATCCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:94) и (5' TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC 3') (SEQ ID NO:95).

Сайты рестрикции эндонуклеазами BlnI и SfoI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента обратно в NPL017580.

Плазмида hIGF1-Ea-hFc mut13.

ПЦР-фрагмент, который содержит мутацию R36Q, амплифицировали из NPL017580 (запатентованный вектор Novartis) с использованием мутагенных олигонуклеотидов (5' TGACASTATAGAATAACATCCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:96) и (5' TGTCTGAGGCGCCCGCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG 3') (SEQ ID NO:97); сайты рестрикции эндонуклеазами BlnI и SfoI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента обратно в NPL017580.

Варианты hIGF1-Ea-hFc mut4 и mut13 дополнительно модифицировали для введения другого лин-

кера (т.е. SEQ ID 22 и 23): линкерные последовательности, соединяющие сайт рестрикции для эндонуклеазы BspEI (соответствующий остатку IGF1 F49-R50) и AelI (в Fc-части), заказывали в лаборатории GeneArt. Линкеры клонировали путем стандартного разрезания и вставки с получением плазмид, содержащих hIGF1-Ea-hFc mut4_E, hIGF1-Ea-hFc mut13_E и hIGF1-Ea-hFc mut13_A. На следующей стадии вносили мутацию G42S.

Плазида hIGF1-Ea-hFc mut4/2_E и hIGF1-Ea-hFc mut13/2_E.

ПЦР-фрагмент, который содержит мутации G42S, амплифицировали из плазмиды hIGF1-Ea-hFc mut2 с использованием олигонуклеотидов (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:88) и (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID NO:98). Сайты рестрикции эндонуклеазами BspEI и SfoI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента в плазмиды hIGF1-Ea-hFc mut4_E и hIGF1-Ea-hFc mut13_E.

Плазида hIGF1-Ea-hFc mut13/2_A.

ПЦР-фрагменты, которые содержат мутации G42S-R36Q, амплифицировали из плазмиды hIGF1-Ea-hFc mut13/2_E с использованием олигонуклеотидов (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (SEQ ID NO:88) и (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (SEQ ID NO:98). Сайты рестрикции эндонуклеазами BspEI и SfoI использовали для клонирования полученного ПЦР-фрагмента в плазмиду hIGF1-Ea-hFc mut13_A.

A3. Продукция рекомбинантного белка.

Продукция в небольшом масштабе.

Два различных метода трансфекции, FuGene и метод, основанный на использовании полиэтиленимина (PEI), использовали для получения вариантов IGF1-Fc.

Трансфицировали (PEI) 100 мл культуры клеток HEK 293F следующим образом: 100 мкг плазмидной ДНК в воде разводили в 7 мл экспрессионной среды (GIBCO, Cat. 12338026) в течение 10 мин при комнатной температуре. Разводили 300 мкг PEI (из стокового раствора 1 мг/мл PEI) в 7 мл экспрессионной среды Freestyle при комнатной температуре. Затем растворы ДНК и PEI смешивали и инкубировали в течение 15 мин перед добавлением к 36 мл культуры клеток HEK 293F с плотностью приблизительно $1,4 \times 10^6$ клеток/мл в 500-мл встряхиваемую колбу. Культуру инкубировали в шейкере Kuehner ISF1-X (Kuehner), установленном на 100 об/мин, 6% CO₂ и 37°C, в течение 6 дней. Затем варианты IGF1-Fc выделяли из очищенных супернатантов клеточных культур с помощью хроматографии с белком А с использованием колонки объемом 1 мл HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) на хроматографической системе AKTA Avant (GE Healthcare). После начальной отмывки буфером PBS связанное вещество элюировали 50 мМ цитратом, pH 3,0, 150 мМ NaCl и сразу же нейтрализовали.

Трансфицировали 100 мл культуры HEK 293F реагентом для трансфекции FuGENE HD (Roche) следующим образом: 100 мкг плазмидной ДНК в воде разводили в 1 мл экспрессионной среды Freestyle (GIBCO, Cat. 12338026), выдержанной при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл FuGENE к разведенной ДНК и инкубировали смесь в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем 1,4 мл смеси ДНК-FuGENE добавляли к 98,6 мл клеточной культуры HEK 293F (Invitrogen) в колбе объемом 500 мл, где плотность клеток составляла приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Культуру инкубировали в шейкере Kuehner ISF1-X (Kuehner), установленном на 100 об/мин, 6% CO₂ и 37°C, в течение 7 дней. Затем варианты IGF1-Fc выделяли из очищенных супернатантов клеточных культур с помощью хроматографии с белком А с использованием колонки объемом 1 мл HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) на хроматографической системе AKTA Avant (GE Healthcare). После начальной отмывки буфером PBS связанное вещество элюировали 50 мМ цитратом, pH 3,0, 150 мМ NaCl и сразу же нейтрализовали.

Продукция в среднем масштабе.

Трансфицировали 9,5 л культуры HEK 293 полиэтиленимином (PEI) следующим образом: 10 мг плазмидной ДНК в буфере TE инкубировали в 250 мл среды OptiMEM1 комнатной температуры [Gibco Cat. № 11058-021] в течение 5 мин. 20 мг полиэтиленимина PEI (из стокового раствора PEI 1 мг/мл) добавляли к 250 мл среды OptiMEM1 комнатной температуры (Gibco Cat. № 11058-021). Затем растворы ДНК и PEI смешивали и инкубировали в течение 15 мин. Затем 500 мл смеси ДНК-PEI добавляли к 9,5 л культуры HEK с плотностью от $0,75 \times 10^6$ до $1,25 \times 10^6$ клеток/мл. Трансфицированные клетки инокулировали при 37°C в биореактор 20 л Wave Cellbag (GE Healthcare, # CB0020L10-03). Помещали Cellbag на биореакторную систему Wave System 20/50 ЕНТ, установленную на 25 об/мин, угол качания 7°, 7% CO₂, 0,50 л/мин поступление воздуха и 37°C. Fc-слитые конструкции выделяли из концентрированных культуральных супернатантов с помощью хроматографии с белком А. После начальной отмывки буфером PBS связанное вещество элюировали 50 мМ цитратом, pH 2,7, 140 мМ NaCl и сразу же нейтрализовали. Затем нейтрализованную фракцию концентрировали ультрафильтрацией и помещали на Superdex 200 в PBS для удаления некоторых загрязняющих агрегатов. Чистота вещества составляла >95% по результатам анализов SDS-PAGE и LC-MS.

A4. Оценка степени агрегации методом SEC-MALS.

Варианты IGF-1-Fc, очищенные с использованием белка А, тестировали в отношении степени агрегации методом эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-

MALS). Измерения осуществляли на системе для ВЭЖХ Agilent 1200 (Agilent Technologies), соединенной с детектором трехугольного светорассеяния (miniDAWN Treos, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). Концентрацию образца отслеживали в текущем режиме с помощью дифференциального рефрактометра (Optilab rEX, Wyatt Technology) с использованием конкретного значения инкремента показателя преломления (dn/dc) 0,186 мл/г. Образцы объемом 50 мкл вносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Данные записывали и обрабатывали с использованием программного обеспечения ASTRA V software (Wyatt Technology). Для определения объемов задержки на детекторе и коэффициентов нормализации для детектора MALS образец BCA (Sigma, A8531) использовали в качестве эталона. Не применяли очистку статистических данных от нежелательных пиков/всплесков, а также коррекцию при размывании зон.

A5. Клеточная культура.

Клетки скелетных мышц человека (skMC) получали из Cambrex (#CC-2561). Человеческие первичные миобласты культивировали в ростовой среде [SkGM, содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS, # 2-01F40-1, Amimed) и 0,1% гентамицина]. Через 4-5 дней (при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности) клетки высевали в ростовую среду с плотностью 150000 клеток/лунку и выращивали (при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности). Через 3 дня после посева миобласты skMC использовали в экспериментах с активацией сигнального пути. Клетки NIH3T3-IGF-1R и NIH3T3-InsR поддерживали в среде D-MEM, содержащей 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Первичные миобласты яванского макака выделяли из икроножной мышцы яванского макака, *Macaca fascicularis*. Клетки культивировали в SkBM, содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS, # 2-01F40-1, Amimed) и 0,1% гентамицина (Life Technologies, #15750-037). Адипоциты 3T3-L1 и клетки C₂C₁₂ получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC-CL-173 и ATCC; #91031101 соответственно). Адипоциты 3T3-L1 поддерживали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, 1,5 г/л NaHCO₃ (ATTC # 30-2002) и дифференцировку инициировали добавлением DMEM, содержащей 10% FCS, 1% пенициллина/стрептомицина, 0,5 мМ IBMX, 1 мкМ дексаметазона. Миобласты C₂C₁₂ подвергали дифференцировке на 3-й день после посева. Для проведения дифференцировки клетки однократно промывали дифференцировочной средой (DM), состоящей из DMEM, дополненной 2% инактивированной нагреванием лошадиной сыворотки (HS; #US 14-403F, Cambrex), 1% пенициллином/стрептомицином и 1% глутамином, и затем инкубировали в DM в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

A6. Biacore.

Свойства связывания оценивали с помощью SPR с использованием биосенсора Biacore T200 при 25°C. Три чипа CM5 (GE, BR-1005-30) готовили с помощью стандартной процедуры связывания аминов. Проточную ячейку 1 использовали для иммобилизации пустой пробы, которая служила в качестве образца для сравнения, в то время как IGF-1 и hIGF-1-Ea-Fc mut_{13/2}_A иммобилизовывали на проточные ячейки для измерений 2 и 3. Уровни иммобилизации адаптировали для индивидуального взаимодействия, и они изменялись в диапазоне 20-143 RU (IGF-1) и 32-113 RU (hIGF-1-Ea-Fc mut_{13/2}_A). Серии разведений рекомбинантного человеческого IGF-1R (R&D Systems, 391-GR) готовили в рабочем буфере, 1× HBS-EP+ (Teknova, H8022), содержащем 30 мМ цитрата и 0,05% BCA, и наносили на чип со скоростью потока 50 мкл/мин. Диапазоны концентрации аналита адаптировали для индивидуального взаимодействия и они изменялись в пределах 1000-3,9 нМ (IGF-1R). Лиганды восстанавливали путем осторожного введения элюирующего буфера Ag/Ab (Thermo Scientific, 21027) в течение 90 с со скоростью 50 мкл/мин. Кинетические константы скорости и KD рассчитывали путем подбора сенсограмм, полученных после вычитания пустой пробы, для модели связывания 1:1.

A7. ELISA.

Для анализа фосфорилирования IGF-1R клетки помещали на 6-луночные планшеты, культивировали в питательной среде в течение 24 (NIH3T3-IGF-1R) или 72 ч (первичные миобласты человека и яванского макака). Клетки выдерживали на истощенной среде в течение 24 (NIH3T3-IGF-1R) или 4 ч (первичные миобласты человека и яванского макака) и затем стимулировали указанными пептидами в течение 15 мин при 37°C. Клетки лизировали буфером PhosphoSafe (Cell Signaling), содержащим ингибиторы протеаз, и очищали центрифугированием при 14000×g в течение 15 мин при 4°C и уровни фосфорилирования IGF-1R анализировали методом ELISA с использованием набора DuoSet IC human phosphor-IGF-1R (R&D Systems).

Для анализа фосфорилирования инсулинового рецептора клетки NIH3T3-InsR клетки наносили с плотностью $0,2 \times 10^6$ клеток на лунку 6-луночного планшета и культивировали в питательной среде в течение 24 ч. Клетки выдерживали в течение 18 ч в бессывороточной среде и затем стимулировали различными лигандами при 37°C в течение 10 мин. Клетки лизировали, как описано выше, и уровни фосфорилирования InsR измеряли методом ELISA с использованием набора DuoSet IC human phosphor-InsR (R&D Systems).

A8. Поглощение глюкозы.

Для измерения поглощения глюкозы адипоциты линии 3T3-L1 и миобласты мышцы линии C₂C₁₂ высевали на 24-луночные планшеты и культивировали в бессывороточной среде DMEM в течение 4 ч.

Затем бессывороточную среду DMEM заменяли буфером KRP (130 mM NaCl, 1,3 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl, 5 mM KCl и 10 mM Na₂HPO₄) или буфером HBS (140 mM NaCl, 2,5 mM MgSO₄, 1,0 mM CaCl, 5 mM KCl и 10 mM HEPES) для адипоцитов 3T3-L1 и C2C12 соответственно. Клетки обрабатывали в течение 1 ч указанными пептидами при 37°C. Поглощение глюкозы измеряли путем добавления 0,4 (адипоциты) или 0,8 (C₂C₁₂) мк-Си [³H]2-деокси-D-глюкозы и 0,1 (адипоциты) или 0,01 (C₂C₁₂) мМ 2-деокси-D-глюкозы в течение 10 (адипоциты) или 5 (C₂C₁₂) мин при комнатной температуре. Среду аспирировали и исследование завершали путем добавления буфера KRP или HBS, содержащего 1 мкМ цитохалазина В. Затем клетки отмывали охлажденным на льду буфером PBS, лизировали с помощью 0,2 М NaOH и определяли радиоактивность путем подсчета сцинтилляций (см. фиг. 5/6).

A9. Фармакокинетические профили.

Взрослым самцам крыс (n=3/группу) вводили внутривенную (в/в) болюсную или подкожную инъекцию hIGF-1-Ea-Fc mut_{13/2_A} или hIGF-1-Ea-Fc mut_{04/2_E} в дозе 10 мг/кг или hIGF-1 (1 мг/кг). Брали серийные образцы крови через 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 и 336 ч после введения вариантов IGF-1 или через 0,083, 0,25, 0,5, 2, 4, 8 и 24 ч после введения hIGF-1. Концентрации в сыворотке рекомбинантных белков определяли с помощью ELISA.

A10. Эффекты hIGF-1-Ea-Fc mut_{13/2A} против дексаметазон-индуцируемой мышечной атрофии.

Дексаметазон (Dex) растворяли в PBS для получения дозы 0,075 мг/кг/день при использовании помпы Alzet 2ML2 в течение 28 дней. Dex объединяли в минипомпах с hIGF-1 в дозе 3,8 мг/кг/день в группе С. Обработку Dex проводили в сочетании с подкожным введением через день hIGF1-Ea-Fc_{13/2_A} в группах D, E и F в дозах 3, 10 и 30 мг/кг соответственно. Помпы заполняли раствором и оставляли на несколько часов при 37°C в PBS до проведения операции по имплантации. Крысам вводили подкожно темгезик в дозе 0,02 мг/кг в объеме 1 мл/кг по меньшей мере за 30 мин до операции, и затем помпы, заполненные указанным выше раствором, имплантировали подкожно на спины крыс под анестезией изофлураном в концентрации 3%. Темгезик вводили подкожно крысам через 24 и 48 ч после операции. Крысы в группах А, В и С ежедневно получали подкожные инъекции PBS. Массу тела измеряли дважды в неделю. Через четыре недели после обработки крыс подвергали эвтаназии с помощью CO₂, отделяли мышцы и взвешивали.

Часть В. Демонстрационные примеры.

Получали и тестировали молекулу предшествующего уровня техники, содержащую Ea-пептид, в которой аминокислотные остатки E3, R71 и S72 удаляли и аминокислоту R37 заменяли на аланин (hIGF1-Ea-Fc-mut3) (SEQ ID NO:27).

Пример 1. Получение экспрессионных ДНК-векторов.

1.1. Экспрессионный ДНК-вектор, кодирующий полипептид-предшественник hIGF-1-Ea, содержащий следующие модификации, конструировали, как описано выше: hIGF1-Ea-Fc mut_{13/2_A} (включающий Fc-часть из hIgG1, несущую мутацию, приводящую к подавлению эффекторной функции L234A, L235A ("LALA") (SEQ ID NO:9)); где G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q); и который связывают с Fc-участком LALA IgG1.

В результате получают следующую последовательность секретируемого белка:

(SEQ ID NO:9)

```
TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLRLEMYCAPLKP
AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
```

1.2. Экспрессионный ДНК-вектор, кодирующий полипептид-предшественник hIGF-1-Ea, содержащий следующие модификации, конструировали, как описано выше в разделе A2.

hIGF1-Ea-Fc mut_{04/2_E} (включающий Fc-участок LALA hIgG1): человеческий белок-предшественник IGF-1, в котором G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E) и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q); и который связан с Fc-участком LALA IgG1.

В результате получают следующую последовательность секретируемого белка:

(SEQ ID NO:12)

```
TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLRLEMYCAPLKP
AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
```

На основе изложенных выше принципов получали следующие дополнительные белки:

пример 54 (hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_E; SEQ ID NO:8),
 пример 56 (hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_C; SEQ ID NO:10),
 пример 50 (hIGF1-Ea-Fc_mut 13/2_F; SEQ ID NO:11),
 пример 58 (hIGF1-Ea-Fc_mut 04/2_A; SEQ ID NO:13),
 пример 59 (hIGF1-Ea-Fc_mut 04/2_F; SEQ ID NO:14).

1.3. Экспрессионный ДНК-вектор, кодирующий полипептид hIGF-1, содержащий следующие модификации, создавали с использованием методов построения ДНК-векторов/ДНК-манипуляций, известных в данной области: hIGF1 G42S (SEQ ID NO:117).

В результате получали следующую белковую последовательность:

(SEQ ID NO:117)

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLE

MYCAPLKPAKSA.

1.4. Экспрессионный ДНК-вектор, кодирующий полипептид hIGF-1, содержащий следующие модификации, создавали с использованием методов построения ДНК-векторов/ДНК-манипуляций, известных в данной области: hIGF1-Ea-mut 03-G42S (SEQ ID NO:118).

В результате получали следующую белковую последовательность:

(SEQ ID NO:118)

GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEM

YCAPLKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAAGNKNYRM

Пример 2. Тестирование устойчивости вариантов IGF-1-Fc к действию протеаз.

Белки, полученные в системах экспрессии клеток млекопитающих, таких как, например, CHO, могут страдать от протеолитической деградации во время экспрессии. Чтобы правильно оценить возможную чувствительность к действию протеаз в процессе продукции стандартным способом, авторы изобретения разработали тест с воздействием протеаз, с использованием очищенного белка и кондиционированных сред культур клеток CHO. Сравнение результатов теста с картиной разрезания, наблюдаемой для варианта IGF-1-Fc, продуцируемого в клетке CHO, обеспечивает подтверждение достоверности теста. Вкратце, клетки CHO культивировали (37°C, 6% CO₂, 85% влажности, 90-150 об/мин) в среде CHODM 122 с плотностью от 2Е5 клеток/мл до 1Е7 клеток/мл. Очищенный супернатант обеспечивал кондиционированные среды, используемые в тесте. Варианты IGF-1-Fc очищали, как описано выше (A3), и вносили в концентрации 100 мкг/мл в кондиционированные среды или в PBS в качестве контроля. После стерильной фильтрации образцы инкубировали при 37°C до 20 дней и образцы для анализа брали в различные моменты времени. Различные продукты деградации можно выделить стандартными методами SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) и интенсивность окраски полос деградации можно определить количественно денситометрическим методом. Результаты представлены на фиг. 17.

Пример 3. Высокоаффинное связывание hIGF-1 и аналогов с рекомбинантным человеческим IGF-1R.

Высокоаффинное связывание hIGF-1 и вариантов IGF-1 с rhIGF 1R измеряли с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (устройство Biacore). Осуществляли анализ прямого связывания. Человеческий IGF-1-Ea Fc Mut 13/2_A и hIGF-1 иммобилизовывали на чипе, и рецептор IGF-1 служил в качестве аналита в растворе. Полученные сенсограммы соответствовали модели взаимодействия 1:1 для расчета равновесных констант диссоциации (KD). Результаты показывают, что связывание hIGF-1-Ea Fc Mut 13/2_A с IGF-1R сравнимо с результатами, полученными для hIGF-1 (фиг. 1).

Пример 4. Индукция фосфорилирования IGF-1R.

Способность hIGF-1 и вариантов hIGF-1 стимулировать фосфорилирование IGF-1R вначале оценивали в клетках NIH3T3, сверхэкспрессирующих человеческий IGF-1R (NIH3T3-IGF-1R), методом ELISA. В указанных клетках фосфорилирование IGF-1R вызывали зависимым от концентрации способом всеми тестируемыми пептидами. Статистическая обработка логистической кривой усредненных данных ELISA показала, что активность (EC₅₀) hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-FC и hIGF1-Ea-Fc mut 04/2_E снижена по сравнению с hIGF-1 (фиг. 2A-B). Однако статистическая обработка логистической кривой усредненных данных ELISA давала вполне сопоставимое максимальное значение ответа для всех тестируемых пептидов (фиг. 2C-D). Способность вариантов hIGF-1 и hIGF-1 стимулировать фосфорилирование эндогенного IGF-1R оценивали в первичных миобластах человека и в миобластах яванского макака. В указанных клетках фосфорилирование IGF-1R индуцировали зависимым от концентрации способом всеми тестируемыми пептидами (фиг. 4B, C). Статистическая обработка логистической кривой усредненных данных ELISA показала, что активность (EC₅₀) вариантов hIGF-1 снижена по сравнению с hIGF-1 (фиг. 4A). Однако статистическая обработка логистической кривой усредненных данных ELISA давала вполне сопоставимое максимальное значение ответа для всех тестируемых пептидов (фиг. 4).

Пример 5. Специфичность к инсулиновому рецептору.

Чтобы проверить, влияют ли аминокислотные модификации вариантов IGF-1 на рецепторную специфичность, эффекты вариантных пептидов IGF-1 на фосфорилирование InsR анализировали в клетках NIH3T3, сверхэкспрессирующих человеческий InsR, методом ELISA. Авторы изобретения обрабатывали

клеточные трансфектанты NIH3T3-InsR различными концентрациями вариантов IGF-1, hIGF-1 и инсулина. Использовали эквимоллярные концентрации указанных пептидов. Результаты экспериментов представлены на фиг. 3/18. Модификации не повлияли на рецепторную специфичность большинства вариантов IGF-1, за исключением вариантов, несущих мутацию G42S (hIGF1-Ea-Fc mut 02, hIGF1-Ea-Fc mut 03, hIGF1-Ea-Fc mut 04/2_E и hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_A), которые, как показано, сохраняли рецепторную специфичность и являлись слабыми индукторами фосфорилирования InsR даже в концентрациях, при которых инсулин вызвал бы максимальный ответ. Неожиданно обнаружили, что hIGF1-Ea Fc mut 13/2_A и hIGF1-Ea Fc mut 04/2_E были значительно менее активными, чем IGF-1, в эффекторных функциях, запускаемых при быстром связывании с инсулиновым рецептором (например, поглощение глюкозы в дифференцированных адипоцитах), как показано на фиг. 5B и D и на фиг. 6. Напротив, hIGF1-Ea Fc mut 13/2_A и hIGF1-Ea Fc mut 04/2_E и hIGF-1 обладали одинаковой эффективностью в IGF-1R-опосредуемых функциях, таких как поглощение глюкозы миообластами линии C2C12 (фиг. 5A и C). Введение мутации G42S в белок IGF-1 (в результате чего получали вариант IGF-1 G42S с последовательностью SEQ ID NO:117), а также в белок hIGF1-Ea-mut 03 (в результате чего получали вариант hIGF1-Ea-mut 03-G42S с последовательностью SEQ ID NO:118) уменьшало фосфорилирование InsR (фиг. 18) в клетках NIH3T3-InsR. Кроме того, указанные мутации оказывают влияние на поглощение глюкозы в адипоцитах и миообластах линии C2C12 соответственно (фиг. 19).

Пример 6. Определение концентрации в сыворотке.

Концентрации в сыворотке hIGF1-Ea-Fc-mut 13/2_A и hIGF1-Ea-Fc mut 04/2_E после введения однократной дозы в/в и п/к самцам крыс Fischer (n=3) определяли методом ELISA, специфичным для hIGF-1Ea 3mut (детали см. в A5 выше). Результаты экспериментов представлены на фиг. 7-A и 7-B. Конечный период полувыведения составлял приблизительно 75,3 и 50,1 ч соответственно. Максимальная концентрация достигалась через 8 и 24 ч (Tmax) при п/к введении дозы соответственно. В то же время, после внутривенного введения hIGF-1 (1,0 мг/кг) уровни hIGF-1 поддавались количественному определению в диапазоне времени 0-8 ч. После достижения Tmax (0,083 ч) наблюдали быстрое снижение концентрации пептида в сыворотке, которое давало в результате кажущийся конечный период полувыведения 1,81 ч. После подкожного введения hIGF-1 (1,0 мг/кг) уровни в сыворотке поддавались количественному определению в течение 8 ч после введения дозы, и максимальную концентрацию наблюдали через 0,5 ч после введения дозы. Таким образом, аналоги IGF-1 демонстрируют значительно улучшенный фармакокинетический профиль по сравнению с IGF-1 человека.

Пример 7. Эффекты hIGF-1-Ea-Fc mut 13/2_A против дексаметазон-индуцированной мышечной атрофии.

Поскольку показано, что IGF-1 стимулирует синтез белка и ингибирует разрушение белка в скелетной мышце, авторы изобретения проверяли, может ли введение hIGF-1-Ea Fc mut 13/2_A предотвратить мышечную атрофию у крыс, получающих дексаметазон. Самцам крыс Wistar проводили непрерывную инфузию с помощью осмотического мини-насоса Alzet 75 мкг дексаметазона/кг/день либо отдельно, либо вместе с носителем (PBS), или hIGF-1. Дополнительная группа животных, которой проводили инфузии дексаметазона, как описано выше, получала через день инъекции п/к hIGF-1-Ea Fc mut 13/2_A. Все животные получали инфузии в течение 28 дней, и затем их умерщвляли. Вес тела измеряли в начале эксперимента и затем на 28-й день после инъекции.

Как и предполагалось, наблюдали существенное снижение массы тела и мышц у крыс, получавших дексаметазон, по сравнению с контрольной группой крыс, получавших носитель (фиг. 8). Инъекция hIGF-1-Ea Fc mut 13/2_A существенно снижала потерю массы тела и мышц (фиг. 8).

В дополнение к описанным выше вариантам полипептидов-предшественников hIGF-1-Ea, следующие дополнительные варианты белков можно получить и использовать согласно изобретению.

Пример 8.

(2b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfknkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:32).

Пример 9.

(4b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfknkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:33).

Пример 10.

(5b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrfyfknkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
aksavraqrhtdmpktqkevhlkna srgsagnknyrm (SEQ ID NO:34).

Пример 11.

(6b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:35).

Пример 12.

(8b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:36).

Пример 13.

(9b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин и аминокислоты R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:37).

Пример 14.

(13b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:38).

Пример 15.

(14b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:39).

Пример 16.

(15b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:40).

Пример 17.

(16b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavraqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:41).

Пример 18.

(17b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:42).

Пример 19.

(18b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:43).

Пример 20.

(19b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:44).

Пример 21.

(20b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdaqlqfvcgdrgrfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemyscaplkp

aksavqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:45).

Пример 22.

(21b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:46).

Пример 23.

(22b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:47).

Пример 24.

(23b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:48).

Пример 25.

(24b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:49).

Пример 26.

(25b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:50).

Пример 27.

(26b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:51).

Пример 28.

(27b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:52).

Пример 29.

(28b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:53).

Пример 30.

(29b) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменены на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 aksavqaqghtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:54).

Пример 31.

(2c) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:55).

Пример 32.

(4c) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrpaqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
 avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:56).

Пример 33.

(5c) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:57).

Пример 34.

(6с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:58).

Пример 35.

(8с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
aqvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:59).

Пример 36.

(9с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют.

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:60).

Пример 37.

(13с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:61).

Пример 38.

(14с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин и аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:62).

Пример 39.

(15с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:63).

Пример 40.

(16с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:64).

Пример 41.

(17с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:65).

Пример 42.

(18с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на глутаминовую кислоту (E), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:66).

Пример 43.

(19с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvdalqfvcgdrghfyfnkptgygsssrappqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp
avqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:67).

Пример 44.

(20с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, ами-

нокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:68).

Пример 45.

(21с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на аланин (A), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин.

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr aapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:69).

Пример 46.

(22с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr papqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:70).

Пример 47.

(23с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr papqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:71).

Пример 48.

(24с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R37 заменяют на пролин (P), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssr papqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:72).

Пример 49.

(25с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоту R74 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssq apqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:73).

Пример 50.

(26с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssq apqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:74).

Пример 51.

(27с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74 и R77 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssq aapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm (SEQ ID NO:75).

Пример 52.

(28с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоты R36 и R37 обе заменяют на глутамин (Q), G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssq apqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:76).

Пример 53.

(29с) G1, P2, E3 удаляют, аминокислоту R36 заменяют на глутамин (Q), R37 заменяют на аланин, G42 заменяют на серин, аминокислоты K68, S69, A70, R71 и S72 удаляют и аминокислоты R74, R77 и R104 заменяют на глутамин (Q).

tlcgaelvda lqfvcgdr gfyfnkptgygsssq aapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkp

avqaqqhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyqm (SEQ ID NO:77).

Пример 54. Экспрессия рекомбинантного IGF-1 в клеточных линиях CHO, дефицитных по рецептору IGF-1.

Экспрессия рекомбинантного IGF-1 в клеточных линиях CHO приводила к ингибированию клеточного роста и низким титрам. На фиг. 11 представлены измерения титров hIGF-1 Ea 3mut (SEQ ID NO:27) во время процесса в биореакторе. Максимальное значение титра hIGF-1 Ea 3mut составляло 8 мкг/мл, что

соответствует 100 мг/л титра антитела (исходя из молярной массы). Средние значения измерений титров рекомбинантного антитела для процесса в биореакторе составляют приблизительно 3 г/л. Одной из причин низкого титра IGF-1 является снижение клеточного роста и низкая жизнеспособность клеток, экспрессирующих IGF-1. Во время процесса экспрессии антител клетки, производные клеток CHO-K1, растут до $2\text{--}2,5 \times 10^7$ клеток/мл, и жизнеспособность клеток составляет свыше 97% во время первых 230–260 ч культивирования. В отличие от этого, клетки, производные клеток CHO-K1, экспрессирующие IGF-1, растут только до $0,5\text{--}0,9 \times 10^7$ клеток/мл, и жизнеспособность клеток снижается уже через 80 ч ниже 97% (см. фиг. 11).

Снижение клеточного роста также можно обнаружить во время совместного культивирования не-трансфицированных клеток, производных от CHO-K1, с IGF-1. На фиг. 12 показано, что родительские клетки, производные от CHO-K1, растут до $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. Во время совместного культивирования клеток, производных от CHO-K1, с IGF-1 дикого типа или с hIGF-1 Ea 3mut (50 мг/л) клеточный рост также существенно ингибируется ($0,9 \times 10^7$ клеток/мл).

На следующей стадии специфический ингибитор тирозинкиназы IGF-1R (NVPAEW541) (In vivo antitumor activity of NVPAEW541 - A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-1R kinase; Carlos Garcia-Echeverria et al.; Cancer Cell; Published Online February 26, 2004 DOI: 10.1016/S1535610804000510) добавляли во время экспериментов по совместному культивированию IGF-1 и клеток, производных от CHO-DUXB11. Ингибирование клеточного роста может быть предотвращено (см. фиг. 13). Данный факт подтверждает, что IGF-1-R запускает сигнал в клетку, приводящий к ингибированию клеточного роста.

На следующей стадии осуществляли нокаут гена IGF-1R с использованием технологии нуклеаз "цинковые пальцы" (ZFN) в клеточных линиях, производных от клеток CHO-K1 и CHO-DUXB11. Создавали ZFN, которые специфически связываются в участке экзона 3 гена IGF-1R. Две плазмиды, каждая из которых кодирует одну субъединицу IGF-1R-специфической ZFN, совместно трансфицировали в клетки, производные от клеток CHO-K1 или CHO-DUXB11. Каждая субъединица ZFN связывает специфические последовательности длиной 18 пар оснований; следовательно, в целом специфически распознается последовательность из 36 п.о. (что позволяет избежать случайного разрезания в других местах генома). Эндонуклеазный домен FokI перестраивают так, чтобы он функционировал только как гетеродимер для разрезания ДНК. Димер ZFN создает запланированные двухцепочечные разрывы в экзоне 3 гена IGF-1R. Благодаря тому, что клеточный процесс соединения негомологичных концов допускает ошибки, указанный двухцепочечный разрыв может приводить к модификации последовательности ДНК и, таким образом, вызывать функциональный нокаут заданного гена. Для клетки, производной от линии CHO-K1, создавали три нокаутных клон (нокаут обоих аллелей гена и мутации со сдвигом рамки): клон 1: Δ2 (SEQ ID NO:99), клон 2: Δ5 (SEQ ID NO:100) и клон 3: Δ2 (SEQ ID NO:101), клон 1: +18 (и замена 14 bps) (SEQ ID NO:103), клон 2: Δ22 (SEQ ID NO:102) и клон 3: Δ114 (SEQ ID NO:104).

Клеточная линия, производная от CHO-DUXB11, в отличие от клеток, производных от линии CHO-K1, является поликлональной и полиплоидной, что затрудняет проведение нокаута гена IGF-1R (больше чем 2 IGF-1R копии/генома необходимо подвергнуть нокауту). Авторы изобретения создали несколько уникальных нокаутных клонов, содержащих мутацию со сдвигом рамки, и подтверждали наличие мутации в двух из них с помощью клонирования TPO и секвенирования. Клон 12: Δ7 (50%) (SEQ ID NO:106)/Δ22 (50%) (SEQ ID NO:105), клон 19: Δ7 (14,5%)/Δ16 (44%)/Δ22 (18%)/Δ22mut (15%). Проценты в скобках соответствуют частоте, с которой данная мутация встречается в 32 бактериальных колониях, для которых проводили секвенирование. Для клона 19 можно предположить, что существует 6 аллелей гена IGF-1R ($3 \times \Delta 16$, $1 \times \Delta 7$, $1 \times \Delta 22$, $1 \times \Delta 22\text{mut}$). Три созданных КО-клона IGF-1R, производных от клеток CHO-K1, культивировали совместно с IGF-1, и ингибирования клеточного роста не обнаружили (см. фиг. 14).

Два созданных КО-клона IGF-1R, производных от клеток CHO-DUXB11, также культивировали при наличии/отсутствии IGF-1. Так же, как и в случае КО-клонов IGF-1R CHO-K1, обнаруживали улучшение клеточного роста КО-клонов по сравнению с клетками, производными от CHO-DUXB11, дикого типа (см. фиг. 15). Для одного из КО-клонов не обнаружили ингибирования клеточного роста в присутствии IGF-1, и другой КО-клон имел в присутствии IGF-1 максимальное число жизнеспособных клеток, сходное с аналогичным показателем для клеток, производных от CHO-DUXB11, без совместного культивирования с IGF-1.

Стратегия клонирования вектора pBW806 (hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A).

Вектор pBW806, кодирующий hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A, получали в результате двух последовательных стадий клонирования. На первой стадии плазмиду 11AARNSC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали рестриктазами XbaI и AscI с целью выделения de novo синтезированного Fc-участка. Одновременно pBW679 (запатентованный вектор Novartis) разрезали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением вспомогательного вектора pBW805. На второй стадии плазмиду 11AARNUC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI

и Sse232I с целью выделения п-концевого участка слитого белка hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A. Одновременно вспомогательный вектор pBW805 разрезали соответственно Sse232I и XbaI, выделяя желаемую основную часть, которую в заключение сшивали с фрагментом 11AARNUC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A_pMA-T с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW806.

Стратегия клонирования вектора pBW807 (hIGF1-Ea-fc mut 13/2_C).

Вектор pBW807, кодирующий hIGF1-Ea-fc mut 13/2_C, получали в результате двух последовательных стадий клонирования. На первой стадии плазмиду 11AARNSC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и AscI с целью выделения de novo синтезированного Fc-участка. Одновременно pBW679 (запатентованный вектор Novartis) разрезали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением вспомогательного вектора pBW805. На второй стадии плазмиду 11AARNWC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_C_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и Sse232I с целью выделения п-концевого участка слитого белка hIGF1-Ea-fc mut 13/2_C. Одновременно вспомогательный вектор pBW805 разрезали соответственно Sse232I и XbaI, выделяя желаемую основную часть, которую в заключение сшивали с фрагментом 11AARNUC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_C_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW807.

Стратегия клонирования вектора pBW808 (hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_F).

Вектор pBW808, кодирующий hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_F (запатентованный вектор Novartis), получали в результате двух последовательных стадий клонирования. На первой стадии плазмиду 11AARNSC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и AscI с целью выделения de novo синтезированного Fc-участка. Одновременно pBW679 (запатентованный вектор Novartis) разрезали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением вспомогательного вектора pBW805. На второй стадии плазмиду 11AARNYC hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_F_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и Sse232I с целью выделения п-концевого участка слитого белка hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_Fc. Одновременно вспомогательный вектор pBW805 разрезали соответственно Sse232I и XbaI, выделяя желаемую основную часть, которую в заключение сшивали с фрагментом 11AARNUC hIGF1-Ea-Fc mut 13/2_F_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW808.

Стратегия клонирования вектора pBW809 (hIGF1-Ea-fc mut 04/2_E).

Вектор pBW809, кодирующий слитую последовательность hIGF1-EA-FC MUT 04/2_E Fc, получали в результате двух последовательных стадий клонирования. На первой стадии плазмиду 11AARNSC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и AscI с целью выделения de novo синтезированного Fc-участка. Одновременно pBW679 (запатентованный вектор Novartis) разрезали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением вспомогательного вектора pBW805. На второй стадии плазмиду 11AARN2C hIGF1-Ea-fc mut 04/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и Sse232I с целью выделения п-концевого участка слитого белка hIGF1-Ea-fc mut 04/2_E. Одновременно вспомогательный вектор pBW805 разрезали соответственно Sse232I и XbaI, выделяя желаемую основную часть, которую в заключение сшивали с фрагментом 11AARNUC hIGF1-Ea-fc mut 04/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW809.

Стратегия клонирования вектора pBW810 (hIGF1-Ea-fc mut 04/2_A).

Вектор pBW810, кодирующий hIGF1-Ea-fc mut 04/2_A, получали в результате двух последовательных стадий клонирования. На первой стадии плазмиду 11AARNSC hIGF1-Ea-fc mut 13/2_E_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и AscI с целью выделения de novo синтезированного Fc-участка. Одновременно pBW679 (запатентованный вектор Novartis) разрезали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением вспомогательного вектора pBW805. На второй стадии плазмиду 11AARN2C hIGF1-Ea-fc mut 04/2_A_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) разрезали XbaI и Sse232I с целью выделения п-концевого участка слитого белка hIGF1-Ea-fc mut 04/2_A. Одновременно вспомогательный вектор pBW805 разрезали соответственно Sse232I и XbaI, выделяя желаемую основную часть, которую в заключение сшивали с фрагментом 11AARNUC hIGF1-Ea-fc mut 04/2_A_pMA-T (запатентованный вектор Novartis) с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW810.

Стратегия клонирования вектора pBW410 (hIGF-1Ea 3mut).

Вектор 0610900pGA4 (запатентованный вектор Novartis), кодирующий последовательность hIGF-1Ea 3mut, разрезали XbaI и MluI в целях выделения синтезированной de novo последовательности, кодирующей IGF. Одновременно pBW165 (запатентованный вектор Novartis) разрезали MluI и XbaI с образо-

ванием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW410.

Стратегия клонирования вектора pBW664 (hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc домен).

Вектор 0905915 (запатентованный вектор Novartis), кодирующий последовательность hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc домен, разрежали XbaI и AscI в целях выделения синтезированной de novo последовательности, кодирующей IGF. Одновременно pBW596 (запатентованный вектор Novartis) разрежали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW664.

Стратегия клонирования вектора pBW666 (hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, A71-72, R77Q-fc домен).

Вектор 0950919 (запатентованный вектор Novartis), кодирующий последовательность hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc домен, разрежали XbaI и AscI в целях выделения синтезированной de novo последовательности, кодирующей IGF. Одновременно pBW596 (запатентованный вектор Novartis) разрежали AscI и XbaI с образованием соответствующего основного фрагмента, несущего регуляторные элементы транскрипции и трансляции, а также маркер селекции/амплификации G418/DHFR. Оба вырезанных элемента сшивали совместимыми концами с получением в результате конечного экспрессионного вектора pBW666.

КО-клон Δ5/Δ22 IGF-1R, производный от клеток CHO-K1, а также КО-клон Δ7/Δ22 IGF-1R, производный от клеток CHO-DUXB11, трансфицировали 5 различными слитыми генами-кандидатами IGF-1-FC (см. фиг. 15). Обнаруживали увеличение общего титра рекомбинантного белка IGF-1-FC в 5-17 раз по сравнению с клеточной линией дикого типа, производной от клеток CHO-K1/CHO-DUXB11, трансфицированной другим слитым геном-кандидатом IGF-1-FC.

Два из слитых генов-кандидатов IGF-1-FC (hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A и hIGF1-Ea-fc mut 04/2_E) экспрессировали в клеточных линиях IGF1R-KO, производных от клеток CHO-K1 или CHO-DUXB11, и клеточные линии культивировали в волновом биореакторе объемом 100 л (процесс культивирования с подпиткой и изменением температуры). Пулы КО-клеток IGF1R, производных от клеток CHO-K1, экспрессирующих hIGF1-Ea-fc mut 13/2 A/4, выращивают до максимального значения плотности жизнеспособных клеток 3×10^7 клеток/мл, которое выше, чем среднее значение для процесса продукции АВ (среднее значение плотности клеток составляет $2,2 \times 10^7$ клеток/мл). По сравнению с клетками дикого типа, производными от CHO-K1, экспрессирующими IGF-1, указанное значение представляет собой увеличение числа жизнеспособных клеток в 3-6 раз (см. фиг. 11). Клетки IGF1R KO, производные от клеток CHO-DUXB11, экспрессирующие hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A/4, выращивали до максимального значения клеточной плотности $1,5-2 \times 10^7$ клеток/мл, которое превышает максимальное значение клеточной плотности, полученное для клеточной линии дикого типа, производной от CHO-DUXB11.

КО-клетки IGF1R, производные от CHO-DUXB11, экспрессирующие hIGF1-Ea-fc mut 13/2_A, подвергали сортировке на клеточном сортере и определяли серийный титр в 24-луночных культурах, а также в периодических культурах объемом 50 мл. На фиг. 15 представлены титры, полученные при культивировании в 24-луночных планшетах для 30 лучших клонов, экспрессирующих hIGF1-Ea-fc mut 13/2 A, среди КО-клонов IGF-1R, производных от клеток CHO-DUXB11, а также для 30 лучших клонов дикого типа, производных от CHO-DUXB11, экспрессирующих hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc домен; на фиг. 16 представлены титры, полученные при культивировании во встряхиваемой колбе, для 15 лучших клонов из каждой группы. В целом, для КО-клонов IGF-1R, производных от клеток CHO-DUXB11, наблюдали 8-кратное увеличение титра при культивировании в 24-луночных планшетах и 7-кратное увеличение титра при культивировании во встряхиваемой колбе.

Пример 55. Культивирование трансформированных клеток CHO, экспрессирующих IGF-1, в биореакторе.

Для культивирования трансформированных клеток, экспрессирующих IGF-1, в биореакторе применяли процесс культивирования с периодической подпиткой. События процесса, такие как начало подпитки и изменение температуры, были отрегулированы по времени для поддержки клеточного роста и увеличения фазы образования продукта за счет сохранения жизнеспособности (Niraj Kumar, Patrick Gammell, Martin Clynes (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture; Cytotechnology (2007) 53:33-46).

Пример 56. Получение IGF-1 из клеток CHO.

В качестве способа получения применяли стандартные методики отделения клеток с глубинным фильтрованием с последующим стерилизующим фильтрованием. Клетки CHO культивировали и собирали в соответствии со стандартными методами, известными специалистам в данной области (например, Curr. Protoc. Protein Sci. 2001 May; Chapter 5: Unit 5.10. Production of recombinant proteins in mammalian cells. Chen S., Gray D., Ma J., Subramanian S.; (Mahesh Prashada, Klaus Tarrach (2006) Depth filtration: Cell clarification of bioreactor offloads, Filtration & Separation Volume 43, Issue 7, September 2006, Pages 28-30).

Пример 57. Дизайн/продукция и использование ZFN, которые специфичны для экзона 3 гена IGF-1R.

Экзон 3 гена IGF-1R и фланкирующие интроны секвенировали в собственных клеточных линиях CHO (SEQ ID NO:110/111). Сначала проводили секвенирование экзона 3 с использованием контига ДНК хомяка, перекрывающего часть кДНК IGF-1R, которая содержит экзон 3, а также мышиную последовательность гена IGF-1R. Создавали праймеры для ПЦР, специфичные к консервативным участкам, и проводили секвенирование полученных ПЦР-продуктов. Полученную последовательность экзона 3 передавали в Sigma для секвенирования фланкирующих интронов экзона 3, а также для создания двух рекомбинантных ZFN, специфических для экзона 3 IGF-1R. Каждая ZFN избирательно распознает и связывается с 18 нуклеотидами на обратной (на 5') и соответственно на прямой (на 3') цепях ДНК. Два сайта связывания разделены пятью нуклеотидами сайта разрезания (SEQ ID NO:107). Описание продукта и методов доступно в Sigma в документе под названием "74188 CompoZr Custom ZFN Tech Bulletin". Компания Sigma разрабатывала прямой и обратный праймеры для ПЦР, специфичные к последовательностям, окружающим интрон (SEQ ID NO:108 и 109), для амплификации экзона 3 IGF-1R в геномную ДНК с образованием ПЦР-продукта размером 501 п.н. Sigma предоставляла набор CompoZr™ (Custom Zinc Finger Nucleases, номер изделия CSTZFN-1 KT, номер лота 08 021019MN), содержащий 20-25 мкг двух ДНК-векторов, кодирующих рекомбинантные ZFN, распознающие обратную (pZFN1) и соответственно прямую (pZFN2) цепи.

E. coli трансформировали - в соответствии с хорошо известными протоколами трансформации - любым вектором и помещали на чашки Петри с агарозой, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Для каждого вектора 4 бактериальные колонии выбирали и размножали. Последовательности ZFN, полученные из четырех образцов очищенной плазмидной ДНК, подтверждали для каждой pZFN с использованием прямого T7 и обратного BHG праймеров и объединяли. Трансфицировали 6 или 10 мкг гомогенной смеси кольцевых векторов pZFN1 и pZFN2 в родительские клетки, производные от клеток CHO-K1 и CHO-DUXB11, три раза для каждого количества, благодаря чему создавали шесть пулов (плюс отрицательный контроль трансфекции) для каждой клеточной линии. Для оценки эффективности действия ZFN в пулах использовали тест для обнаружения мутаций Surveyor (Transgenomics, номер в каталоге 706025) в дни 3 и 10 после дня проведения трансфекции (который считали как день 0), как описано в конфиденциальном протоколе, предоставленном Sigma. Геномную ДНК пулов выделяли с использованием набора GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma, номер в каталоге G1N70-1KT), экзон 3 амплифицировали в реакции ПЦР с использованием прямого и обратного секвенирующих праймеров IGF-1R, комплементарных последовательностям, фланкирующим интрон. Затем ПЦР-продукт денатурировали при высоких температурах. При постепенном понижении температуры некоторое количество продукта дикого типа и мутированного продукта гибридизуется с образованием двухцепочечной ДНК с пропусками вокруг сайта расщепления, которые разрезают с помощью фермента Surveyor®. Конечные продукты анализировали с использованием системы для проведения гель-электрофореза под названием Iab901. Для всех 6 трансфицированных пулов, кроме основного ПЦР-продукта, состоящего из 501 п.н., выявляли две дополнительные полосы меньшего размера, приблизительно 277 и 224 п.н., соответствующие фрагментам с любой стороны от сайта разрезания, и таким образом подтверждали активность ZFN в клетках. Через семь дней после трансфекции пулы подвергали клеточной сортировке и клонировали в 10×96-луночных планшетах.

В pZFN-трансфицированной клеточной линии, производной от линии CHO-K1, выращивали 507 клонов в 96-луночных планшетах и оценивали их на наличие мутаций с использованием теста для выявления мутаций Surveyor®, описанного выше (геномную ДНК клонов отбирали в 96-луночные планшеты с использованием набора Extract-N-Amp Blood PCR от Sigma, номер в каталоге XNAB2). 42 клон были положительными (обнаруживали две полосы меньшего размера), что означало, что их геном содержал по меньшей мере одну мутированную копию экзона 3, и проводили секвенирование их ПЦР-амплифицированного экзона 3 IGF-1R. Как и предполагалось для клонов, созданных из псевдодиплоидной клеточной линии, производной от CHO-K1, хроматограммы секвенирования ДНК показали два максимальных перекрывающихся сигнала одинаковой интенсивности, свидетельствующих о наличии двух копий целевой последовательности, 6 клонов имели мутации в обеих копиях, из которых 3 клон имели мутации, располагающиеся рядом со стоп-кодонами в обеих копиях (SEQ ID NO:99 и 100) или рядом со стоп-кодонами в одной копии и большую делецию в другой копии (SEQ ID NO:101). Последовательности двух копий в указанных 3 клонах подтверждали с помощью клонирования TOPO (набор TA cloning, Invitrogen, номер в каталоге K4575-40; использовали 6 бактериальных колоний). Все 3 К.О. клон выращивали со значениями клеточной плотности, более высокими, чем родительские клетки, и при внесении 50 мг/л IGF-1 ('hIGF-1 Ea 3mut' (SEQ ID NO:27)) в стандартную среду клоны росли с такой же плотностью, что и родительские клетки в стандартной среде (фиг. 8). Клон с генотипом Δ5/Δ22 (SEQ ID NO:100/102) выбирали для трансфекции геном белка инсулиноподобного фактора роста 1, например человеческого IGF-1 (SEQ ID NO:1 или 5) или его вариантов (например, SEQ ID NO:8-14).

В pZFN-трансфицированной клеточной линии, производной от линии CHO-DUXB11, вырастало только 117 клонов при культивировании в 96-луночных планшетах, и их оценивали в отношении мута-

ций с помощью теста Surveyor. 28 клонов имели по меньшей мере одну мутированную копию экзона 3 (обнаруживали две полосы меньшего размера), но секвенирование показало, что все клоны по-прежнему имели копии дикого типа; последовательность дикого типа имела более высокую интенсивность на хроматограммах секвенирования, чем мутированная последовательность. Клеточная линия, производная от линии CHO-DUXB11, является мутировавшей и поликлональной; определение кариотипов показывает до восьми копий хромосом в некоторых клетках, что затрудняет определение ожидаемого числа копий гена. Два клон, в которых мутированную последовательность, которую выявляли ($\Delta 22$ или $\Delta 16$), получали рядом со стоп-кодонами, отбирали для второго раунда трансфекции pZFN; 3 пула для каждого из оригинальных клонов создавали с использованием 10 мкг смешанных pZFN. Через семь дней после трансфекции пулы клонировали на основании результатов FACS в 6×96-луночных планшетах. Выращивали 379 клонов, для 211 из которых проводили секвенирование экзона 3 IGF-1R (проведение теста Surveyor невозможно, поскольку последовательность уже мутированная), и перекрывающиеся последовательности анализировали визуально на хроматограммах. Большинство клонов, для которых проводили секвенирование, являлись гетерозиготами дикого типа с ожидаемой мутированной последовательностью ($\Delta 22$ или $\Delta 16$); ~20% клонов имели дикий тип и 2 мутированные последовательности (преимущественно с делециями около сайта разрезания); в двух клонах обнаруживали 4 различных последовательности (подтвержденные клонированием ТОРО, но одна из последовательностей была либо только дикого типа, либо только с одной нуклеотидной вставкой); 2 клон являлись КО-клонами, оба с 2 выявленными последовательностями ($\Delta 16/\Delta 22$ и $\Delta 16/\Delta 5$), но их рост в присутствии IGF-1 был лишь немного выше, чем рост родительской клеточной линии, производной от CHO-DUXB11. Таким образом, три клон с генотипом $\Delta 22/\Delta 7$ /дикий тип, $\Delta 16/\Delta 7$ /дикий тип и $\Delta 16/\Delta 22$ /дикий тип были выбраны для третьего раунда трансфекции с использованием pZFN (их последовательности подтверждали клонированием ТОРО, при этом из клон отбирали 32 бактериальные колонии и проводили секвенирование). Каждый из трех клонов трансфицировали два раза с 8 мкг pZFN. После получения двух пулов от каждого клон (жизнеспособность >91%, через 7-9 дней) их объединяли и культивировали в течение приблизительно 6-8 недель в присутствии 50 мкг/л IGF-1 (для отбора наиболее устойчивых клеток). За два дня до проведения клонирования, основанного на применении FACS, клетки отделяли от IGF-1 (для обеспечения связывания IGF-1-Cy5 и отбора 5% клеток, не имеющих флуоресцентного сигнала). Три пула клеток подвергали основанному на FACS клонированию, всего в 9×96-луночных планшетах.

Конструируют ПЦР-праймер, связывающийся с последовательностью участка разрезания экзона 3 IGF-1R дикого типа и позволяющий проводить эффективный скрининг мутантных клонов. ПЦР проводят с использованием праймера для прямого секвенирования IGF-1R; исходя из того, что ПЦР работает всегда, можно сделать вывод, что если клон является ПЦР-отрицательным, значит, он не содержит последовательности дикого типа, или рост клон является недостаточным (выделено слишком мало ДНК вследствие небольшого количества выросших клеток). Из 389 выращенных клонов, отобранных таким образом, 58 клонов были негативными, и их секвенировали. В 30 из указанных клонов последовательность дикого типа не обнаружили, и в случае 22 клонов мутации были со сдвигом рамки (13 клонов с двумя последовательностями $\Delta 22/\Delta 7$ из клон $\Delta 27$ /дикий тип). Оценивали их рост при наличии и отсутствии 50 мкг/л IGF-1, и клон с наилучшим ростом при наличии IGF-1 (также среди клонов с наилучшим ростом при отсутствии IGF-1) с последовательностями $\Delta 22/\Delta 7$ (проверенными клонированием в ТОРО-системе) выбирали для трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими белки с последовательностями SEQ ID NO:8-14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант человеческого белка IGF-1, в котором аминокислота глицин в положении 42 относительно последовательности SEQ ID NO:1 человеческого белка IGF-1 удалена или заменена на серин.
2. Вариант по п. 1, где аминокислота G42 удалена.
3. Вариант по п. 1, где белок IGF-1 включает следующие модификации:
 - а) аминокислота E3 удалена,
 - б) аминокислота G42 заменена на серин и
 - с) аминокислота R37 заменена на аланин.
4. Вариант по п. 1, где белок IGF-1 включает следующие модификации:
 - а) аминокислоты G1, P2 и E3 удалены,
 - б) аминокислота G42 заменена на серин и
 - с) аминокислота R37 заменена на аланин.
5. Вариант по п. 1, где белок IGF-1 включает следующие модификации:
 - а) аминокислоты G1, P2 и E3 удалены,
 - б) аминокислота G42 заменена на серин,
 - с) аминокислота R36 заменена на глутамин и
 - д) аминокислота R37 заменена на аланин.
6. Вариант по п. 1, где белок IGF-1 включает следующие модификации:

- а) аминокислоты G1, P2 и E3 удалены,
 б) аминокислота G42 заменена на серин и
 с) аминокислота R36 заменена на глутамин или удалена; или аминокислота R37 заменена на глутаминовую кислоту либо пролин или удалена; или аминокислоты R36 и R37 обе заменены на глутамин или удалены.

7. Фармацевтическая композиция для лечения мышечного расстройства у пациента, содержащая вариант человеческого белка IGF-1 по любому из пп.1-6.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где мышечное расстройство представляет собой мышечную атрофию.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где мышечная атрофия выбрана из саркопении, связанной с ожирением, саркопении и мышечной атрофии, связанной с диабетом.

K _D (нМ)	hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	hIGF-1
IGF-1R	373	204

Фиг. 1

A

Лиганд	EC ₅₀ нМ ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_02	2.7*
hIGF1-Ea-Fc_mut_03	9.8**
hIGF1-Ea-Fc_mut_04	3.04*
hIGF1-Ea-Fc_mut_12	3.81*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13	4.17*
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	5.26 ± 0.7#

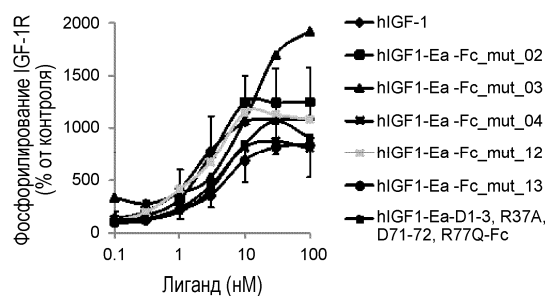
*n=2, **n=1, #P<0.0001 в сравнении с hIGF-1, t-тест

B

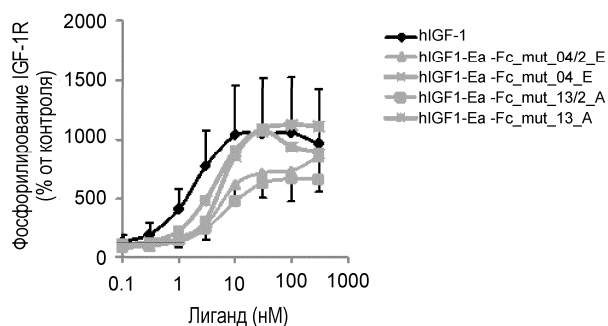
Лиганд	EC ₅₀ нМ ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	7.4 ± 1.3#
hIGF1-Ea-Fc_mut_04_E	5.5*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	5.7*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13_A	4.1*

*n=2; #P<0.0001 при сравнении с hIGF-1, t-тест

C



D



Фиг. 2

A

Лиганд	Усредненные максимальные значения кратности увеличения относительно контроля $\pm$ SD
Инсулин	20.8 ± 6.1
hIGF-1	$3.9 \pm 0.8^{\#}$
hIGF1-Ea -Fc_mut_02	$5.9 \pm 1.1^{\#,\$}$
hIGF1-Ea -Fc_mut_03	8.6^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_04	12.5^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_12	21.9^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13	15.2^*
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	18.8 ± 3.4

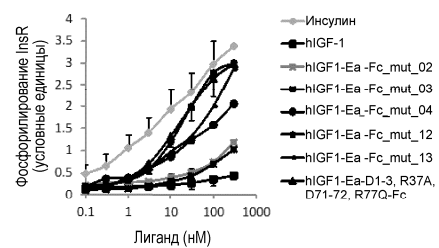
* $n=2$; $\#P<0.001$ при сравнении с инсулином; $\$P<0.05$ в сравнении с IGF-1

B

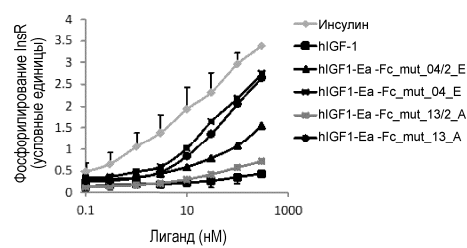
Лиганд	Усредненные максимальные значения кратности увеличения относительно контроля $\pm$ SD
Инсулин	20.8 ± 6.1
hIGF-1	$3.9 \pm 0.8^{\#}$
hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E	5.2^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_04_E	9.4^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13/2_A	5.4^*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13_A	12.4^*

* $n=2$; ; $\#P<0.001$ при сравнении с инсулином

C



D



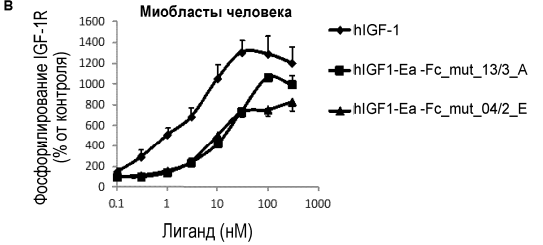
Фиг. 3

A

Пептид	Миобласты человека		Миобласты яванского макака	
	EC50 (нМ) ± SEM	Emax (% от контроля) ± SEM	EC50 (нМ) ± SEM	Emax (% от контроля) ± SEM
hIGF-1	4.1 ± 1.4	1309 ± 119	5.1 ± 0.7	786 ± 182
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	16.8 ± 3.1*	1069 ± 28	25.4 ± 4.0#	779 ± 145
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	10.6 ± 2.4	834 ± 83*	23.8 ± 2.0#	724 ± 152

*P < 0.05 в сравнении с человеческими миобластами, обработанными hIGF-1.
#P < 0.05 в сравнении с миобластами яванского макака, обработанными hIGF-1.
ANOVA, метод Тьюки.

B



C



Фиг. 4

A

Лиганд	EC50 (нМ) ± SD	Максимальная кратность увеличения относительно контроля ± SD
Инсулин	11.5 ± 5.6**	1.37 ± 0.08
hIGF-1	1.3 ± 0.9	1.32 ± 0.06
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	4.3 ± 2.0	1.31 ± 0.11
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	3.7 ± 1.1	1.37 ± 0.10

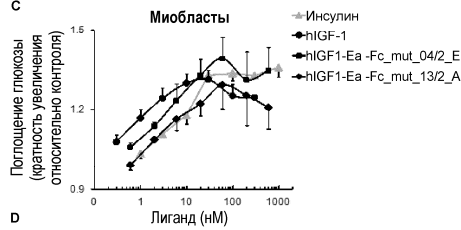
**P < 0.001 при сравнении с IGF-1, ANOVA, критерий Тьюки.

B

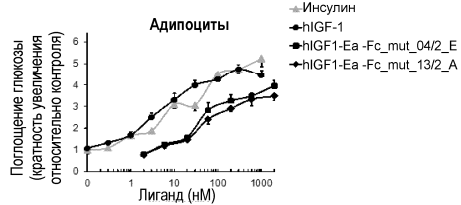
Лиганд	EC50 (нМ) ± SD	Максимальная кратность увеличения относительно контроля ± SD
Инсулин	9.1 ± 3.7	5.2 ± 1.00
hIGF-1	5.0 ± 1.4	4.6 ± 0.68
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	49.9 ± 4.6**,***	3.2 ± 0.25#
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	49.0 ± 28.4**,***	4.0 ± 0.47

P < 0.05 и **P < 0.01 при сравнении с инсулином, ***P < 0.001 при сравнении с IGF-1 ANOVA, критерий Тьюки.

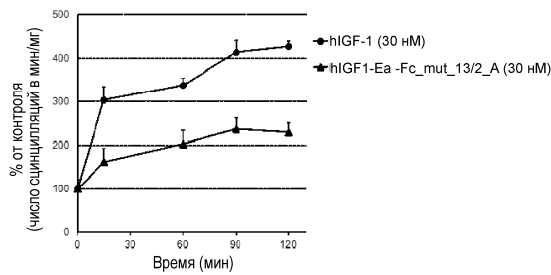
C



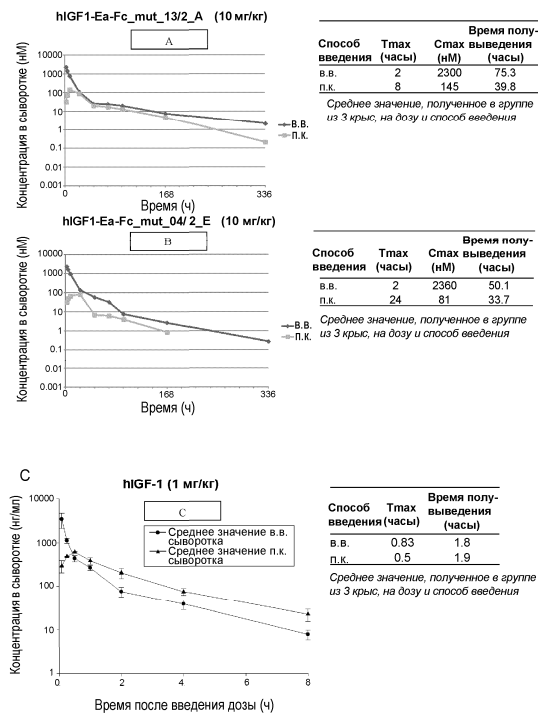
D



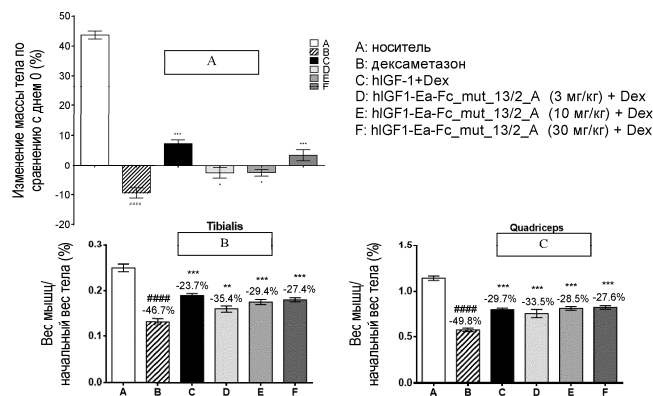
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

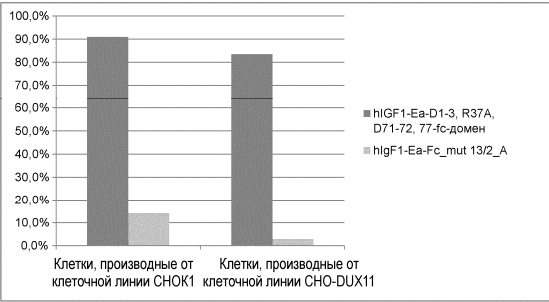


Фиг. 8

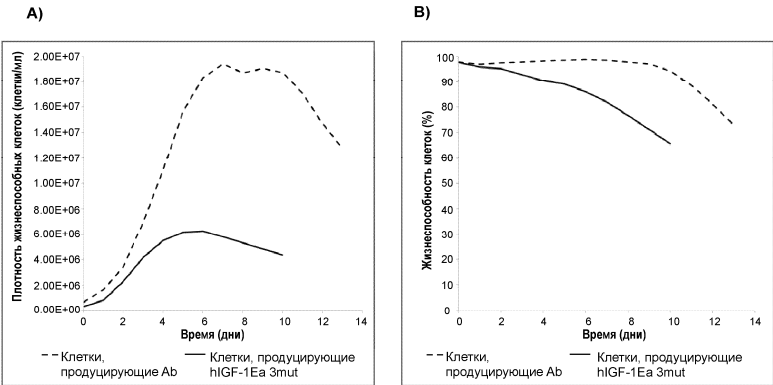
Название	Титр в супернатанте (мг/л)	Концентрация (мг/мл)	Агрегаты (%)
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.:78)	33	0.88	37.0
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A: SEQ ID NO.: 9	83.1	1.65	9.8
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 79)	11.79	0.49	37.4
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.:80)	16.98	0.61	43.2
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 81)	18.57	0.54	71.9
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.:82)	21.6	0.56	53.8
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 83)	26.97	0.84	49.4
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 84)	8.7	0.4	85.5
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 85)	13.38	0.41	48.5
hlgF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc-домен (SEQ ID NO.: 86)	78.6	1.96	21.0

D: делеция; fc-домен: Fc-часть из hlgG1

Фиг. 9

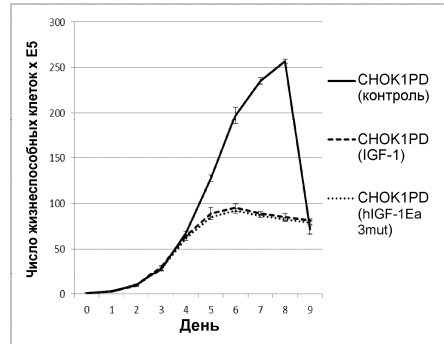


Фиг. 10

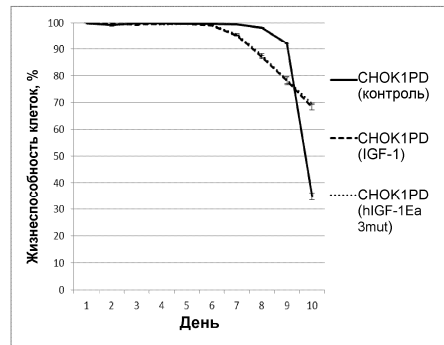


Фиг. 11

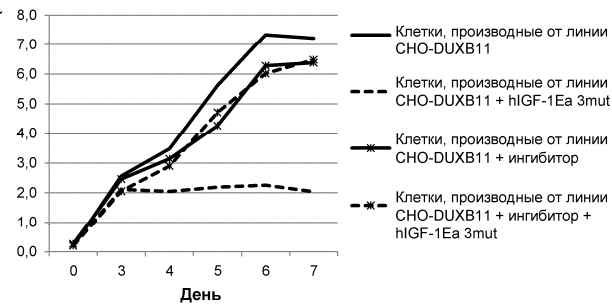
А)



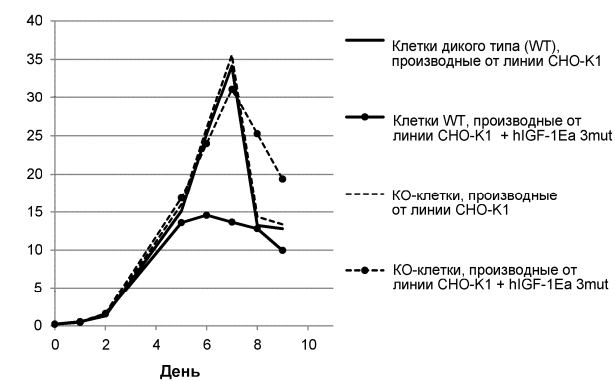
В)



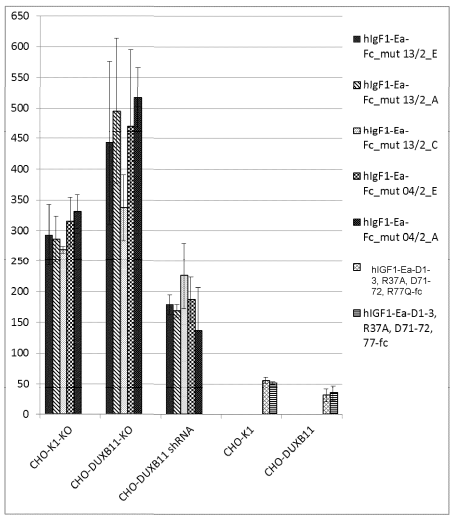
Фиг. 12

Плотность жизнеспособных клеток ($\times 10^6$)

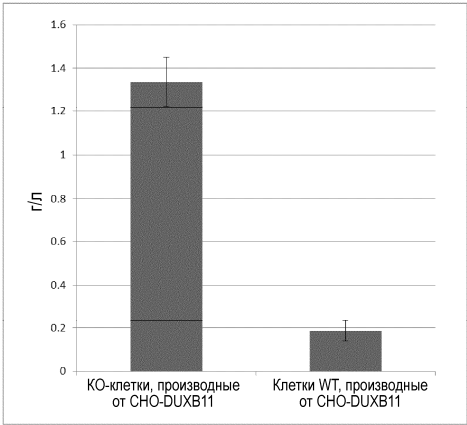
Фиг. 13

Плотность жизнеспособных клеток ($\times 10^6$)

Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

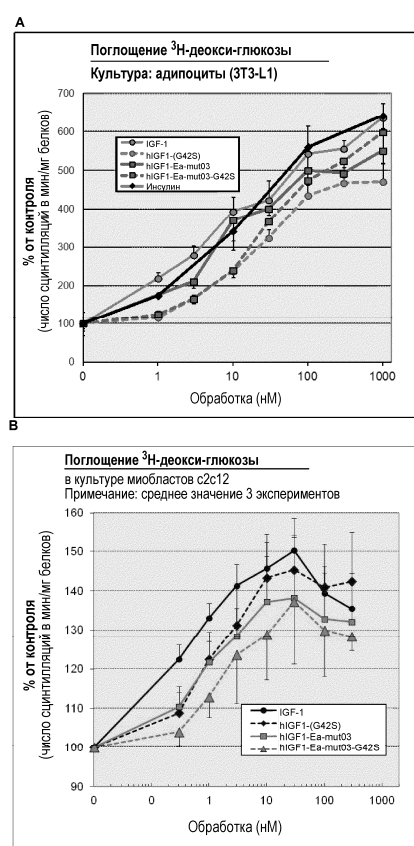
Генерическое название	Аминокислота в положении 42	Выход, мг/л	% агрегации	% полноразмерного белка после воздействия белков (клетки, производ. от CHO-K1)	% полноразмерного белка после воздействия белков (клетки, производ. от клеток линии CHO-DUXB11)
hlgF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-Ic (SEQ ID No. 113) (партия 1)	глицин	11.33	18.3	21.6% ± 13.4% (n=4)	27.06%
hlgF1-Ea-hFc_mut02 (SEQ ID No.: 29)	серин	13.64	5.8	9.6% ± 13.9% (n=3)	N/A
hlgF1-Ea-hFc_mut03 (SEQ ID No.: 114)	глицин	5.17	41.8	44.9% ± 12.1% (n=3)	N/A
hlgF1-Ea-hFc_mut04 (SEQ ID No.: 30)	глицин	10.34	21.1	60.2% ± 12.2% (n=4)	73.6 %
hlgF1-Ea-hFc_mut12 (SEQ ID No.: 116)	глицин	8.46	17.7	44.3% ± 15.1% (n=3)	67.9%
hlgF1-Ea-hFc_mut13 (SEQ ID No.: 31)	глицин	10.18	24.0	64.2% ± 11.5% (n=4)	80.0%
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (SEQ ID No.: 08)	серин	11.62	7.4	95.4% ± 4.4% (n=3)	97.3%± 3.4% (n=2)
hlgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (SEQ ID No.: 09)	серин	11.72	8.6	93.4%	95.3%
hlgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (SEQ ID No.: 12)	серин	11.51	7.3	95.0% ± 4.6% (n=3)	98.7%± 1.9% (n=2)

Фиг. 17

Лиганд	Кратность увеличения усредненных максимальных значений в сравнении с контролем $\pm$ SD
Инсулин	21.0 ± 6.9
IGF-1	3.7 ± 0.8
IGF-1 G42S	3.3 ± 1.1
hIGF1-Ea-mut 03	5.6 ± 2.0
hIGF1-Ea-mut 03-G42S	$2.2 \pm 0.5^*$

* $P < 0.05$ при сравнении с BVS855

Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2