

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090882 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.18

(22) Дата подачи заявки
2018.10.01

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ
ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРАПИИ

(31) 62/566,898; 62/583,276; 62/626,365;
62/678,183; 62/721,396

(32) 2017.10.02; 2017.11.08; 2018.02.05;
2018.05.30; 2018.08.22

(33) US

(86) PCT/US2018/053747

(87) WO 2019/070577 2019.04.11

(71) Заявитель:
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Астарита Джузеппе, Деннис Марк С.,
Гетц Дженнифер А., Генри Анастасия,
Кариолис Михалис, Махон Катал,
Силверман Адам П., Сривастава
Анкита, Аллман Джули, Ван
Цзюньхуа, Зучеро Джой Ю (US)

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

(57) В данном документе предложены слитые белки, содержащие ферменты для ферментной заместительной терапии и Fc-область, а также способы применения таких белков для лечения лизосомных болезней накопления. Также в данном документе предложены способы переноса агентов через гематоэнцефалический барьер.

A1

202090882

202090882

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562109EA/032

СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/566898, поданной 2 октября 2017 г., предварительной заявке на патент США № 62/583276, поданной 8 ноября 2017 г., предварительной заявке на патент США № 62/626365, поданной 5 февраля 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/678183, поданной 30 мая 2018 г., и предварительной заявке на патент США № 62/721396, поданной 22 августа 2018 г., раскрытие которых в полном объеме и во всех целях включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

[0002] Данная заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 28 сентября 2018 г., называется 102342-000350PC-1103949_SL.txt и имеет размер 580464 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Лизосомные болезни накопления (LSD) представляют собой относительно редкие наследственные метаболические заболевания в результате дефектов лизосомальной функции. Как правило, LSD вызваны дефицитом одного фермента, который участвует в разрушении продуктов метаболизма в лизосоме. Накопление продукта в результате отсутствия ферментативной активности оказывает негативное влияние на различные системы органов и может приводить к тяжелым симптомам и преждевременной смерти. Большинство LSD также имеют существенную неврологическую компоненту, в диапазоне от прогрессирующей нейродегенерации и тяжелых когнитивных нарушений до эпилептических, поведенческих и психиатрических расстройств. Рекомбинантную форму фермента, дефицит которого наблюдается при LSD, можно использовать для лечения расстройства, но такие варианты терапии могут оказывать слабый эффект на мозг вследствие затруднений при доставке рекомбинантного фермента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В данном документе предложены слитые белки, содержащие ферменты для ферментной заместительной терапии (ERT) и способы их применения для лечения лизосомных болезней накопления (LSD).

[0005] В некоторых аспектах в данном документе предложен белок, содержащий:

(a) первый Fc-полипептид, слитый с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом; и

(b) второй Fc-полипептид, который образует Fc-димер с первым Fc-полипептидом.

[0006] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй

Fc-полипептид не содержит последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части.

[0007] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS), вариант IDS или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234.

[0008] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), вариант SGSH или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:119 и 120. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:119 и 120.

[0009] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой кислую сфингомиелиназу (ASM), вариант ASM или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123.

[0010] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой β -глюкоцереброзидазу (GBA), вариант GBA или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:93 и 94. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:93 и 94.

[0011] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой глицин-богатый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-богатый линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:239) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид не связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом химическим перекрестно-сшивающим агентом, *например*, слитый

полипептид не содержит непептидную связь или неполипептидный линкер.

[0012] В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит, от N-к С-концу: ERT-фермент, вариант ERT-фермента или его каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и первый Fc-полипептид.

[0013] В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид слит с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой глицин-богатый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-богатый линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:239) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид не связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом химическим перекрестно-сшивающим агентом, *например*, слитый полипептид не содержит непептидную связь или неполипептидный линкер.

[0014] В некоторых вариантах осуществления N-конец первого Fc-полипептида и/или N-конец второго Fc-полипептида связаны с ERT-ферментом. В некоторых вариантах осуществления N-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а N-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

[0015] В некоторых вариантах осуществления С-конец первого Fc-полипептида и/или С-конец второго Fc-полипептида связаны с ERT-ферментом. В некоторых вариантах осуществления С-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а С-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

[0016] В некоторых вариантах осуществления N-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а С-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом. В некоторых вариантах осуществления С-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а N-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

[0017] В некоторых вариантах осуществления белок содержит один ERT-фермент, а N-конец или С-конец первого Fc-полипептида связан с ERT-ферментом. В некоторых вариантах осуществления белок содержит два ERT-фермента (*например*, точно два ERT-фермента). В некоторых вариантах осуществления белок содержит точно один или точно два ERT-фермента, варианта фермента или его каталитически активных фрагмента.

[0018] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид.

[0019] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид, каждый, содержат модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

В некоторых вариантах осуществления Fc-димер представляет собой Fc-гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления один из Fc-полипептидов содержит замену T366W, а другой Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй Fc-полипептид содержит замену T366W. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:117, 232 и 236. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит замену T366W, а второй Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:118, 233 и 237.

[0020] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат нативный FcRn-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид не имеют эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат модификацию, которая снижает эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в позиции 234 и Ala в позиции 235 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, дополнительно включает замену Gly в позиции 329 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом SGSN и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:149, 150, 152 и 153.

[0021] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотные изменения относительно нативной Fc-последовательности, которые продлевают сывороточное время полужизни. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные изменения включают замены Trp в позиции 252, Thr в позиции 254 и Glu в позиции 256 в соответствии с нумерацией EU. В альтернативных других вариантах осуществления аминокислотные изменения включают замены Leu в позиции 428 и Ser в позиции 434 в соответствии с нумерацией EU. В альтернативных дополнительных вариантах осуществления аминокислотные изменения включают замену Ser или Ala в позиции 434 в соответствии с нумерацией EU.

[0022] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид специфически связываются с трансферриновым рецептором (TfR).

[0023] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат по меньшей мере две замены в позициях, выбранных из группы, состоящей из 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-

полипептид содержат по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в указанных позициях.

[0024] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержат одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 380, 391, 392 и 415 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержат одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 414, 424 и 426 в соответствии с нумерацией EU.

[0025] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат Trp в позиции 388. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат ароматическую аминокислоту в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe.

[0026] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат по меньшей мере одну позицию, выбранную из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0027] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 позиций, выбранных из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0028] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат 11 позиций следующим образом: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0029] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат CH₃-домен с по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 111-

217 любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:156-229. В некоторых вариантах осуществления остатки в по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 позициях, соответствующих позициям по нумерации EU 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 413, 414, 415, 416, 421, 424 и 426, любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229 не удалены или не замещены.

[0030] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:157. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:169. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:193. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217.

[0031] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229).

[0032] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229).

[0033] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229).

[0034] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид связываются с апикальным доменом TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

[0035] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид имеют идентичность аминокислотной последовательности, составляющую по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92% или 95% по сравнению с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления соответствующий Fc-полипептид дикого типа представляет собой Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[0036] В некоторых вариантах осуществления поглощение ERT-фермента в головном мозге (*например*, при использовании соответствующей животной модели, такой как описанные в данном документе) больше, чем поглощение ERT-фермента в отсутствие первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида или поглощение ERT-фермента без модификаций первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида, которые приводят к связыванию TfR. В некоторых вариантах осуществления поглощение ERT-фермента в головном мозге является по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз большим по сравнению с поглощением ERT-фермента в отсутствие первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида или по сравнению с поглощением ERT-фермента без модификаций первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида, которые приводят к связыванию TfR.

[0037] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид не модифицирован для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а второй Fc-полипептид модифицирован для специфического связывания TfR. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид модифицирован для специфического связывания TfR, а второй Fc-полипептид не модифицирован для связывания с рецептором ГЭБ.

[0038] В некоторых вариантах осуществления белок не содержит последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части.

[0039] В некоторых аспектах в данном документе предложен полипептид, содержащий Fc-полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом, причем Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом.

[0040] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет IDS, вариант IDS или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234. В некоторых вариантах

осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234.

[0041] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет SGSN, вариант SGSN или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:119 и 120. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:119 и 120.

[0042] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет ASM, вариант ASM или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123.

[0043] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет GBA, вариант GBA или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:93 и 94. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:93 и 94.

[0044] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой глицин-богатый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-богатый линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:239) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид не связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом химическим перекрестно-сшивающим агентом, *например*, слитый полипептид не содержит непептидную связь или неполипептидный линкер.

[0045] В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит, от N-к С-концу: ERT-фермент, вариант ERT-фермента или его каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и первый Fc-полипептид.

[0046] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ

ID NO:115, 117, 231, 232, 235 и 236. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:149 и 150. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит замену T366W. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:118, 233 и 237. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:152-155. В некоторых вариантах осуществления полипептид дополнительно содержит другой Fc-полипептид. В некоторых вариантах осуществления другой Fc-полипептид содержит замену T366W или содержит замены T366S, L368A и Y407V и образует Fc-димер со слитым полипептидом ERT-фермент - Fc.

[0047] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит нативный FcRn-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид не имеет эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит модификацию, которая снижает эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в позиции 234 и Ala в позиции 235 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, дополнительно включает замену Gly в позиции 329 в соответствии с нумерацией EU.

[0048] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит аминокислотные изменения относительно нативной Fc-последовательности, которые продлевают сывороточное время полужизни. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные изменения включают замены Tyr в позиции 252, Thr в позиции 254 и Glu в позиции 256 в соответствии с нумерацией EU.

[0049] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид специфически связывается с TfR.

[0050] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит по меньшей мере две замены в позициях, выбранных из группы, состоящей из 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в указанных позициях.

[0051] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 380, 391, 392 и 415 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две или три замены в позициях, включающих 414, 424 и 426 в соответствии с нумерацией EU.

[0052] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит Trp в позиции 388. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит ароматическую аминокислоту в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe.

[0053] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну позицию, выбранную из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0054] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 позиций, выбранных из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0055] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит 11 позиций следующим образом: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0056] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит СНЗ-домен с по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 111-217 любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90. В некоторых вариантах осуществления остатки в по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 позициях, соответствующих позициям по нумерации EU 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 413, 414, 415, 416, 421, 424 и 426, любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90 не удалены или не замещены.

[0057] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид связывается с апикальным доменом TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

[0058] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид имеет идентичность аминокислотной последовательности, составляющую по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92% или 95% по сравнению с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления соответствующий Fc-полипептид дикого типа представляет собой Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[0059] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид не содержит последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части.

[0060] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий Fc-полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом, причем Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен вектор, содержащий полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую другой Fc-полипептид. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ получения описанного в данном документе полипептида, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый полинуклеотидом.

[0061] В некоторых аспектах в данном документе предложен белок, содержащий:

- (a) первую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR;
- (b) вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, причем первая и вторая полипептидные цепи образуют Fc-димер; и
- (c) ERT-фермент, вариант ERT-фермента или его каталитически активный фрагмент, который связан с модифицированным Fc-полипептидом по (a) или с Fc-полипептидом по (b).

[0062] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет IDS, вариант IDS или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234.

[0063] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет SGSN, вариант SGSN или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:119 и 120. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:119 и 120.

[0064] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет ASM, вариант ASM или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной

последовательностью любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123.

[0065] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет GBA, вариант GBA или ее каталитически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:93 и 94. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:93 и 94.

[0066] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан с модифицированным Fc-полипептидом по (a). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан с Fc-полипептидом по (b). В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) не модифицирован для связывания с рецептором ГЭБ. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR.

[0067] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан (*например*, слит) с модифицированным Fc-полипептидом по (a) или с Fc-полипептидом по (b) пептидной связью или полипептидным линкером с образованием слитого полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой глицин-богатый линкер. В некоторых вариантах осуществления глицин-богатый линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:239) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент не связан с модифицированным Fc-полипептидом по (a) или с Fc-полипептидом по (b) химическим перекрестно-сшивающим агентом, *например*, слитый полипептид не содержит непептидную связь или неполипептидный линкер.

[0068] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан с N-концом модифицированного Fc-полипептида по (a) или с N-концом Fc-полипептида по (b). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан с C-концом модифицированного Fc-полипептида по (a) или с C-концом Fc-полипептида по (b).

[0069] В некоторых вариантах осуществления белок содержит два ERT-фермента. В некоторых вариантах осуществления один ERT-фермент связан с модифицированным Fc-полипептидом по (a), а другой ERT-фермент связан с Fc-полипептидом по (b). В некоторых вариантах осуществления оба ERT-фермента связаны с N-концом или оба связаны с C-концом соответствующих Fc-полипептидов. В некоторых вариантах осуществления один ERT-фермент связан с N-концом модифицированного Fc-полипептида по (a), а другой ERT-фермент связан с C-концом Fc-полипептида по (b). В некоторых вариантах осуществления один ERT-фермент связан с C-концом модифицированного Fc-полипептида по (a), а другой ERT-фермент связан с N-концом Fc-

полипептида по (b).

[0070] В некоторых вариантах осуществления каждый из Fc-полипептидов по (a) и (b) содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления один из Fc-полипептидов содержит замену T366W, а другой Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) содержит замену T366W, а Fc-полипептид по (b) содержит замены T366S, L368A и Y407V. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:117, 232 и 236. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) содержит замены T366S, L368A и Y407V, а Fc-полипептид по (b) содержит замену T366W. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:118, 233 и 237.

[0071] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) и/или Fc-полипептид по (b) содержат нативный FcRn-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) и Fc-полипептид по (b) не имеют эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) и/или Fc-полипептид по (b) содержат модификацию, которая снижает эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в позиции 234 и Ala в позиции 235 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, дополнительно включает замену Gly в позиции 329 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) связан с ERT-ферментом IDS и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид по (b) связан с ERT-ферментом SGSN и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:149, 150, 152 и 153.

[0072] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид по (a) и/или Fc-полипептид по (b) содержат аминокислотные изменения относительно нативной Fc-последовательности, которые продлевают сывороточное время полужизни. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные изменения включают замены Tug в позиции 252, Thr в позиции 254 и Glu в позиции 256 в соответствии с нумерацией EU.

[0073] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере две замены в позициях, выбранных из группы, состоящей из 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в указанных позициях.

[0074] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 380,

391, 392 и 415 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две или три замены в позициях, включающих 414, 424 и 426 в соответствии с нумерацией EU.

[0075] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Trp в позиции 388. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит ароматическую аминокислоту в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe.

[0076] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну позицию, выбранную из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0077] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 позиций, выбранных из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0078] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит 11 позиций следующим образом: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

[0079] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит CH3-домен с по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 111-217 любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:156-229. В некоторых вариантах осуществления остатки в по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 позициях, соответствующих позициям по нумерации EU 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 413, 414, 415, 416, 421, 424 и 426, любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229 не удалены или не

замещены.

[0080] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:157. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:169. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:193. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217.

[0081] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

[0082] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231.

[0083] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228 (*например*, SEQ ID NO:228), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229 (*например*, SEQ ID NO:229), а вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235.

[0084] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид связывается с апикальным доменом TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

[0085] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет идентичность аминокислотной последовательности, составляющую по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92% или 95% по сравнению с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления

соответствующий Fc-полипептид дикого типа представляет собой Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[0086] В некоторых вариантах осуществления поглощение ERT-фермента в головном мозге (*например*, при использовании соответствующей животной модели, такой как описанные в данном документе) больше, чем поглощение ERT-фермента в отсутствие Fc-полипептида или поглощение ERT-фермента без модификаций Fc-полипептида, которые приводят к связыванию TfR. В некоторых вариантах осуществления поглощение ERT-фермента в головном мозге является по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз большим по сравнению с поглощением ERT-фермента в отсутствие Fc-полипептида или по сравнению с поглощением ERT-фермента без модификаций Fc-полипептида, которые приводят к связыванию TfR.

[0087] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ лечения LSD, включающий введение белка или полипептида, описанных выше, нуждающемуся в этом пациенту. В некоторых вариантах осуществления указанный способ снижает накопление токсичных продуктов метаболизма в организме пациента, *например*, происходит снижение количества токсичных продуктов метаболизма в головном мозге и/или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациента.

[0088] В связанных аспектах в данном документе предложен способ снижения накопления токсичных продуктов метаболизма в организме пациента, имеющего LSD, включающий введение белка или полипептида, описанных выше, указанному пациенту. В некоторых вариантах осуществления указанный способ снижает накопление токсичных продуктов метаболизма в головном мозге и/или ЦСЖ пациента.

[0089] В некоторых вариантах осуществления LSD представляет собой синдром Хантера, а ERT-фермент представляет собой IDS. В некоторых вариантах осуществления токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата дисахариды и/или полученные из дерматансульфата дисахариды.

[0090] В некоторых вариантах осуществления LSD представляет собой синдром Санфилиппо А, а ERT-фермент представляет собой SGSH. В некоторых вариантах осуществления токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата олигосахариды (*например*, гексасахариды).

[0091] В некоторых вариантах осуществления LSD представляет собой болезнь Ниманна - Пика, а ERT-фермент представляет собой ASM. В некоторых вариантах осуществления токсичный продукт метаболизма включает сфингомиелин.

[0092] В некоторых вариантах осуществления LSD представляет собой болезнь Гоше или болезнь Паркинсона, а ERT-фермент представляет собой GBA. В некоторых вариантах осуществления токсичный продукт метаболизма включает глюкозилцерамид.

[0093] В некоторых вариантах осуществления общее количество токсичного продукта метаболизма снижается по меньшей мере на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по

сравнению с общим количеством токсичного продукта метаболизма в отсутствие белка или полипептида. В данном документе описаны иллюстративные методы анализа для определения активности ERT-фермента и накопления субстрата.

[0094] В некоторых аспектах в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок или полипептид, описанные выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0095] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ отслеживания накопления субстрата для оценки активности IDS, включающий:

(a) разрушение клеток в клеточном или тканевом образце или микровезикул в образце жидкости от субъекта, которому вводят белок или полипептид, описанные выше, для того, чтобы вскрыть микровезикулы для получения подлежащего анализу раствора гликозаминогликана (GAG);

(b) расщепление раствора GAG по меньшей мере одной гепариназой (*например*, гепариназой I, гепариназой II и гепариназой III) и хондроитиназой B, чтобы получить полученные из GAG дисахариды;

(c) анализ полученных из GAG дисахаридов методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС); и

(d) определение уровней полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов, причем снижение уровней полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов по сравнению с контролем с отсутствием активности IDS указывает на повышение активности IDS в образце по сравнению с контролем.

[0096] В некоторых вариантах осуществления этап разрушения клеток или микровезикул включает по меньшей мере один цикл замораживания-размораживания и/или по меньшей мере один этап обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из тканевого образца, а способ включает по меньшей мере три, четыре или пять циклов замораживания-размораживания. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой мышь с дефицитом активности IDS. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой отличного от человека примата. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека, имеющего синдром Хантера.

[0097] В некоторых вариантах осуществления уровни полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов снижаются по меньшей мере на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с уровнями полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов в контроле с отсутствием активности IDS. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клеточный или тканевый образец того же типа клеток или ткани, полученный от субъекта до введения белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клеточный или тканевый образец того же типа клеток или ткани с известным дефицитом активности IDS. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид повышает

активность IDS в образце по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз по сравнению с активностью IDS в контроле.

[0098] В других аспектах в данном документе предложен способ отслеживания накопления субстрата для оценки активности SGSH, включающий:

(a) разрушение клеток в клеточном или тканевом образце или микровезикул в образце жидкости от субъекта, которому вводят белок или полипептид, описанные выше, для того, чтобы вскрыть микровезикулы для получения подлежащего анализу раствора гликозаминогликана (GAG);

(b) расщепление раствора GAG по меньшей мере одной гепариназой, чтобы получить полученные из GAG дисахариды;

(c) анализ полученных из GAG дисахаридов методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС); и

(d) определение уровней полученных из гепарансульфата дисахаридов, причем снижение уровней полученных из гепарансульфата дисахаридов по сравнению с контролем с отсутствием активности SGSH указывает на повышение активности SGSH в образце по сравнению с контролем.

[0099] В некоторых вариантах осуществления этап разрушения клеток или микровезикул включает по меньшей мере один цикл замораживания-размораживания и/или по меньшей мере один этап обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из тканевого образца, а способ включает по меньшей мере три, четыре или пять циклов замораживания-размораживания. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой мышь с дефицитом активности SGSH. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой отличного от человека примата. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека, имеющего синдром Санфилиппо А.

[0100] В некоторых вариантах осуществления уровни полученных из гепарансульфата дисахаридов снижаются по меньшей мере на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с уровнями полученных из гепарансульфата дисахаридов в контроле с отсутствием активности SGSH. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клеточный или тканевый образец того же типа клеток или ткани, полученный от субъекта до введения белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой клеточный или тканевый образец того же типа клеток или ткани с известным дефицитом активности SGSH. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид повышает активность SGSH в образце по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз по сравнению с активностью SGSH в контроле.

[0101] В других аспектах в данном документе предложен способ переноса агента через ГЭБ млекопитающего, включающий взаимодействие с ГЭБ белка, который

связывается с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ, причем белок связан с агентом и переносит связанный агент через ГЭБ. В некоторых вариантах осуществления повышается максимальная концентрация ($C_{\text{макс}}$) агента в головном мозге млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления агент применим для лечения LSD.

[0102] В других аспектах в данном документе предложен способ лечения LSD, включающий введение млекопитающему белка, который связывается с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ, причем белок связан с агентом для лечения LSD, таким образом, обеспечивая воздействие агента на головной мозг млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления белок повышает $C_{\text{макс}}$ агента в головном мозге по сравнению с агентом, связанным с референсным белком, который связывается с TfR с меньшей аффинностью. В некоторых вариантах осуществления референсный белок связывается с TfR с аффинностью около 600 нМ или меньше.

[0103] В некоторых вариантах осуществления TfR представляет собой TfR примата. В некоторых вариантах осуществления TfR примата представляет собой TfR человека. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с апикальным доменом TfR.

[0104] В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR с аффинностью от около 100 нМ до около 200 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR с аффинностью от около 110 нМ до около 150 нМ.

[0105] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная концентрация агента представляет собой концентрацию, которая позволяет лечить один или более симптомов LSD у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой заместительное белковое терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления агент или заместительное белковое терапевтическое средство представляет собой фермент.

[0106] В некоторых вариантах осуществления фермент в большей степени снижает накопление токсических продуктов метаболизма в головном мозге млекопитающего, имеющего LSD, когда он связан с белком, по сравнению со случаем, когда фермент связан с референсным белком. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой IDS, а LSD представляет собой синдром Хантера. В некоторых вариантах осуществления токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата дисахариды и/или полученные из дерматансульфата дисахариды. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой SGSH, а LSD представляет собой синдром Санфилиппо А. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой ASM, а LSD представляет собой болезнь Ниманна - Пика. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой GBA, а LSD представляет собой болезнь Гоше.

[0107] В некоторых вариантах осуществления агент содержит переменную область антитела. В некоторых вариантах осуществления агент содержит фрагмент

антитела. В некоторых вариантах осуществления агент содержит Fab или scFv.

[0108] В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит ненативный сайт связывания, способный связывать TfR. В некоторых вариантах осуществления белок содержит переменную область антитела, которая специфически связывается с TfR. В некоторых вариантах осуществления белок содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления белок содержит Fab или scFv.

[0109] В некоторых вариантах осуществления белок, связанный с агентом, вводят как часть фармацевтически приемлемого носителя.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0110] На Фиг. 1 проиллюстрированы очистка и анализ слитого белка IDS-Fc, содержащего Fc-полипептид, связанный с ферментом идуронат-2-сульфатазы (IDS), и модифицированный Fc-полипептид, который связывается с трансферриновым рецептором (TfR).

[0111] На Фиг. 2 проиллюстрированы результаты анализа аффинности связывания для слитых белков IDS-Fc, проанализированных на Фиг. 1, демонстрирующие, что слитые белки связываются с TfR.

[0112] На Фиг. 3 приведены данные, демонстрирующие *in vitro* активность IDS слитых белков IDS-Fc, проанализированных на Фиг. 1.

[0113] На Фиг. 4 приведены данные, демонстрирующие, что клетки с нокаутом, в которых отсутствует IDS, имеют повышенные уровни полученных из гепарансульфата дисахаридов согласно оценке в анализе ЖХ-МС/МС, а экспрессия IDS в клетках с нокаутом IDS (НО) устраняет нокаутный фенотип.

[0114] На Фиг. 5A проиллюстрировано, что слитые белки IDS-Fc в виде N-концевого монозима или C-концевого монозима, содержащего один и тот же TfR-связывающий Fc полипептид (*m. e.* CH3C.35.21.17) устраняют накопление гепарансульфата и дерматансульфата в IDS НО клетках. На Фиг. 5B проиллюстрировано, что N-концевой монозим («ETV:IDS 35.21.17») имеет сравнимую клеточную эффективность с IDS. На Фиг. 5C проиллюстрировано дозозависимое снижение накопленных S^{35} -сульфат-меченных белков в фибробластах пациентов с МПС II, обработанных слитым белком IDS-Fc («ETV:IDS») или IDS; n=8. На Фиг. 5D проиллюстрирована оценка М6PR-зависимого клиренса S^{35} -меченных белков в фибробластах пациентов с МПС II, обработанных повышающимися дозами слитого белка IDS-Fc («ETV:IDS») или IDS в присутствии или отсутствие 5 мМ М6Р; n=3. На Фиг. 5C-5D: «ETV:IDS» = ETV:IDS 35.23.2; на графиках отображены средние значения по повторным экспериментам \pm СПС.

[0115] На Фиг. 6 приведены данные, иллюстрирующие уровни гепаран- и дерматансульфата в сыворотке от мышей дикого типа (ДТ), которым вводили дозы базового раствора, или мышей IDS НО, которым вводили дозы IDS или слитого белка IDS-Fc («ETV:IDS»), в течение времени. «ETV:IDS» = ETV:IDS 35.21.

[0116] На Фиг. 7 приведены данные, иллюстрирующие, что общие уровни дисахаридов D0SO, DOA0 и D0a4 (называемые «общими уровнями GAG») в периферических тканях мышей IDS HO оценивали через семь суток после введения одной внутривенной инъекции 40 мг/кг слитого белка IDS-Fc («ETV:IDS») или 5,3 мг/кг IDS и сравнивали с обработанными базовым раствором мышами IDS HO и мышами дикого типа; n=8 для групп IDS HO и n=3 для групп дикого типа. Данные приведены как среднее \pm СПС с p-значениями: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; ** p < 0,01 и **** p < 0,0001. «ETV:IDS» = ETV:IDS 35.21.

[0117] На Фиг. 8 приведены данные, иллюстрирующие концентрацию слитых белков IDS-Fc в головном мозге мышей с нокином человеческого TfR (TfR^{M/c} НИ) после периферического введения слитого белка IDS-Fc ETV:IDS 35.21 или контрольного слитого белка IDS-Fc, в котором отсутствует мутация, обеспечивающая связывание TfR («IDS:Fc»).

[0118] На Фиг. 9А приведены данные, иллюстрирующие концентрацию слитых белков IDS-Fc в головном мозге мышей TfR^{M/c} НИ после периферического введения слитого белка IDS-Fc ETV:IDS 35.21.17.2 или ETV:IDS 35.23.2, или контрольного слитого белка IDS-Fc, в котором отсутствует мутация, обеспечивающая связывание TfR («IDS:Fc»). На Фиг. 9В приведены данные, иллюстрирующие концентрацию слитого белка IDS-Fc ETV:IDS 35.21 или IDS:Fc в печени мышей TfR^{M/c} НИ после одной внутривенной инъекции дозы 50 мг/кг; n=4-5. На графиках отображены средние значения \pm СПС.

[0119] На Фиг. 10А-10С проиллюстрировано, что ETV:IDS снижает GAG в головном мозге и периферических тканях мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ. Мышам IDS HO x TfR^{M/c} НИ вводили одну внутривенную инъекцию 40 мг/кг ETV:IDS или 14,2 мг/кг IDS или же четыре дозы в неделю, как описано в примере 2. Концентрацию IDS в сыворотке (Фиг. 10А) и тканях (Фиг. 10В) измеряли у мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ после одной дозы. Проиллюстрирована тканевая ФК через 2 ч после введения дозы; n=4. На графиках отображены средние значения \pm СПС и p-значения: непарный t-критерий Стьюдента. На Фиг. 10С проиллюстрированы уровни дисахаридов D0SO, DOA0 и D0a4 («общие уровни GAG») в головном мозге, ЦСЖ и периферических тканях мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ, измеренные после одной дозы или нескольких доз ETV:IDS или IDS и сравниваемые с обработкой базовым раствором и мышами дикого типа; n=8 для групп IDS HO x TfR^{M/c} НИ и n=5 для группы дикого типа. Данные приведены как среднее \pm СПС и p-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; ** p < 0,01, *** p \leq 0,001 и **** p \leq 0,0001.

[0120] На Фиг. 11 проиллюстрированы очистка и анализ слитого белка ASM-Fc, содержащего Fc-область, связанную с двумя ферментами кислой сфингомиелиназы (ASM).

[0121] На Фиг. 12 приведены данные, демонстрирующие *in vitro* активность ASM

слитого белка ASM-Fc, проанализированного на Фиг. 11.

[0122] На Фиг. 13 приведены данные, демонстрирующие, что слитый белок ASM-Fc, проанализированный на Фиг. 11, снижает накопление сфингомиелина в клетках ASM HO, с применением анализа на основе визуализации.

[0123] На Фиг. 14 приведены данные, демонстрирующие, что слитый белок ASM-Fc, проанализированный на Фиг. 11, снижает накопление сфингомиелина в клетках ASM HO, с применением анализа на основе ЖХ-МС/МС.

[0124] На Фиг. 15 приведены данные, демонстрирующие *in vitro* активность N-сульфоглюкозамин сульфогидролазы (SGSH) слитых белков SGSN-Fc, описанных в примере 6.

[0125] На Фиг. 16 приведены данные, демонстрирующие, что клетки с нокаутом (НО), в которых отсутствует SGSN, имеют повышенные уровни полученных из гепарансульфата дисахаридов согласно оценке в анализе ЖХ-МС/МС. $n=3-4$ независимо от линии клеток; данные отображены как средние значения \pm СПС.

[0126] На Фиг. 17 приведены данные, иллюстрирующие, что слитый белок SGSN-Fc, проанализированный на Фиг. 15, устраняет накопление гепарансульфата в клетках SGSN HO.

[0127] На Фиг. 18 проиллюстрирована взаимосвязь между аффинностью сконструированного TfR-связывающего полипептида hTfR и действием на головной мозг в течение времени у мышей TfR^{M/q} НИ. Точки представляют кумулятивное действие на головной мозг в течение времени (ППК) разных сконструированных аффинных вариантов TfR-связывающего полипептида после введения одной дозы 50 мг/кг мышам TfR^{M/q} НИ. Концентрацию полипептида в головном мозге (по измерению huIgG1) рассчитывали на разные сутки после введения дозы (в диапазоне 1-10 суток). Данные обобщены по трем независимым исследованиям, причем в каждом исследовании было по $n=4-5$ мышей на группу.

[0128] На Фиг. 19 проиллюстрирована взаимосвязь между аффинностью сконструированного TfR-связывающего полипептида hTfR и максимальной концентрацией в головном мозге у мышей TfR^{M/q} НИ. Точки представляют максимальную концентрацию в головном мозге разных аффинных вариантов полипептида, измеренную на 1 сутки после введения одной дозы 50 мг/кг. Данные обобщены по трем независимым исследованиям, причем в каждом исследовании было по $n=4-5$ мышей на группу.

[0129] На Фиг. 20 проиллюстрирована взаимосвязь между аффинностью сконструированного TfR-связывающего полипептида hTfR и соотношением концентрации в головном мозге и плазме у мышей TfR^{M/q} НИ. Точки представляют соотношение максимальной концентрации в головном мозге и плазме разных аффинных вариантов полипептида, измеренное на 1 сутки после введения одной дозы 50 мг/кг. Данные обобщены по трем независимым исследованиям, причем в каждом исследовании было по $n=4-5$ мышей на группу.

[0130] На Фиг. 21А и 21В проиллюстрирована концентрация huIgG1 в плазме (Фиг.

21А) и лизатах головного мозга (Фиг. 21В) мышей с нокином TfR^{M/c} (НИ) после одной системной инъекции 50 мг/кг слитых полипептидов анти-BACE1_Ab153, СНЗС35.21:Ab153, СНЗС35.20:Ab153 или СНЗС35:Ab153 (среднее ± СПС, n=5 на группу).

[0131] На Фиг. 21С проиллюстрирована концентрация эндогенного мышинового Аβ в лизате головного мозга мышей TfR^{M/c} НИ после одной системной инъекции 50 мг/кг слитых полипептидов анти-BACE1_Ab153, СНЗС35.21:Ab153, СНЗС35.20:Ab153 или СНЗС35:Ab153 (среднее ± СПС, n=5 на группу).

[0132] На Фиг. 21D проиллюстрирована количественная оценка методом Вестерн-блоттинга белка TfR в головном мозге, нормализованного к актину в лизате головного мозга мышей TfR^{M/c} НИ, после одной системной инъекции 50 мг/кг слитых полипептидов анти-BACE1_Ab153, СНЗС35.21:Ab153, СНЗС35.20:Ab153 или СНЗС35:Ab153 (среднее ± СПС, n=5 на группу).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[0133] Мы разработали слитые белки, которые содержат фермент для ферментной заместительной терапии (ERT), связанный с Fc-полипептидом. Эти белки можно использовать для лечения лизосомных болезней накопления (LSD). В некоторых случаях белок содержит димерный Fc-полипептид, в котором один из мономеров Fc-полипептида связан с ERT-ферментом. Fc-полипептиды могут повышать сывороточное время полужизни и, в некоторых случаях, могут быть модифицированы для придания дополнительных функциональных свойств белку. Также в данном документе описаны слитые белки, которые облегчают доставку ERT-фермента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Эти белки содержат Fc-полипептид и модифицированный Fc-полипептид, которые образуют димер, и ERT-фермент, связанный с Fc-областью и/или модифицированной Fc-областью. Модифицированная Fc-область может специфически связываться с рецептором ГЭБ, таким как трансферриновый рецептор (TfR). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS) или каталитически активный вариант или фрагмент IDS дикого типа, *например*, IDS дикого типа человека. В других вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), кислую сфингомиелиназу (ASM), β-глюкоцереброзидазу (GBA) или каталитически активный вариант или фрагмент SGSH, ASM или GBA дикого типа, *например*, SGSH, ASM или GBA дикого типа человека.

[0134] Также мы разработали способ переноса терапевтических агентов, которые связаны с TfR-связывающими полипептидами и белками, через ГЭБ для лечения заболевания. Мы обнаружили, что необходимая аффинность связывания TfR для переноса терапевтического агента через ГЭБ зависит от мишени терапевтического агента, а также от механизма действия, который обеспечивает эффективность при лечении заболевания. В частности, мы обнаружили, что применение полипептидов и белков, которые имеют большую аффинность к TfR, приводит к большей C_{макс}, но и более быстрому клиренсу.

[0135] В случае некоторых вариантов терапии, такие варианты белковой

заместительной терапии можно использовать для лечения, *например*, LSD, которое включает применение ERT-ферментов, таких как IDS (*например*, для лечения синдрома Хантера), а также других, причем достижение высокой $C_{\text{макс}}$ терапевтического средства необходимо в окне дозирования, так как большая внеклеточная концентрация в свою очередь будет обуславливать повышенную внутриклеточную концентрацию белка. После доставки в клетки внутриклеточное время полужизни доставленного белка составляет больший период времени по сравнению с временем удержания в плазме. Кроме того, наличие высокой $C_{\text{макс}}$ может благоприятно сказываться на замещении фермента, так как высокая концентрация может обуславливать повышенную скорость преобразования субстрата ферментом. В частности, для повышения $C_{\text{макс}}$ в головном мозге применимы полипептиды и белки, которые имеют диапазон аффинности к TfR 50-250 нМ.

Определения

[0136] В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явным образом не следует иное. Так, *например*, ссылка на «полипептид» может включать две или более таких молекул и т. п.

[0137] В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», когда они применяются для модификации количества, указанного числовым значением или диапазоном, указывают, что числовое значение, а также допустимые отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники, *например*, $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в пределах предполагаемого значения приведенного значения.

[0138] «Фермент для ферментной заместительной терапии» или «ERT-фермент» относится к ферменту, дефицит которого наблюдается при лизосомной болезни накопления. «Вариант ERT-фермента» относится к функциональному варианту, включая аллельные и сплайс-варианты, ERT-фермента дикого типа или его фрагмента, причем вариант ERT-фермента имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего ERT-фермента дикого типа или его фрагмента, *например*, при анализе в идентичных условиях. «Каталитически активный фрагмент» ERT-фермента относится к части полноразмерного ERT-фермента или его варианта, причем каталитически активный фрагмент имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного ERT-фермента или его варианта, *например*, при анализе в идентичных условиях.

[0139] В контексте данного документа «идуронат сульфатаза» или «идуронат-2-сульфатаза», или «IDS» относится к идуронат-2-сульфатазе (EC 3.1.6.13), которая представляет собой фермент, участвующий в лизосомальной деградации гликозаминогликанов гепарансульфата и дерматансульфата. Дефицит IDS связан с мукополисахаридозом II типа, также известным как синдром Хантера. В контексте

данного документа термин «IDS» как компонент белка, который содержит Fc-полипептид, является каталитически активным и включает функциональные варианты, в том числе аллельные варианты и сплайс-варианты, IDS дикого типа или его фрагмента. Последовательность изоформы I IDS человека, которая является человеческой последовательностью, считающейся канонической последовательностью, доступна под записью UniProt P22304 и кодируется геном IDS человека в Xq28. Полноразмерная последовательность приведена как SEQ ID NO:91. В контексте данного документа «зрелая» последовательность IDS относится к форме полипептидной цепи, в которой отсутствует сигнальная и пропептидная последовательности полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность зрелого полипептида IDS человека приведена как SEQ ID NO:92, что соответствует аминокислотами 34-550 полноразмерной человеческой последовательности. В контексте данного документа «усеченная» последовательность IDS относится к каталитически активному фрагменту полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность типового усеченного полипептида IDS человека приведена как SEQ ID NO:114, что соответствует аминокислотами 26-550 полноразмерной человеческой последовательности. Структура IDS человека была хорошо изучена. Иллюстративная структура доступна под кодом доступа PDB 5FQL. Структура также описана в Nat. Comm. 8:15786 doi: 10.1038/ncomms15786, 2017. Также были описаны последовательности IDS отличных от человека приматов, включая шимпанзе (запись UniProt K7BKV4) и макака-резус (запись UniProt H9FTX2). Последовательность IDS мыши доступна под записью Uniprot Q08890. Вариант IDS имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего IDS дикого типа или его фрагмента, *например*, при анализе в идентичных условиях. Каталитически активный фрагмент IDS имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного IDS или его варианта, *например*, при анализе в идентичных условиях.

[0140] В контексте данного документа «сульфоглюкозамин сульфогидролаза», «N-сульфоглюкозамин сульфогидролаза» или «SGSH» относится к N-сульфоглюкозамин сульфогидролазе (EC 3.10.1.1), которая представляет собой фермент, участвующий в лизосомальной деградации гепарансульфата. Мутации в этом гене связаны с синдромом Санфилиппо А, одним из типов лизосомной болезни накопления - мукополисахаридозом III, который возникает в результате нарушения деградации гепарансульфата. В контексте данного документа термин «SGSH» как компонент белка, который содержит Fc-полипептид, является каталитически активным и включает функциональные варианты, в том числе аллельные варианты и сплайс-варианты, SGSH дикого типа или его фрагмента.

Последовательность SGSN человека доступна под записью UniProt P51688 и кодируется геном SGSN человека в 17q25.3. Полноразмерная последовательность приведена как SEQ ID NO:119. В контексте данного документа «зрелая» последовательность SGSN относится к форме полипептидной цепи, в которой отсутствует сигнальная последовательность полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность зрелого полипептида SGSN человека приведена как SEQ ID NO:120, что соответствует аминокислотами 21-502 полноразмерной человеческой последовательности. В контексте данного документа «усеченная» последовательность SGSN относится к каталитически активному фрагменту полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Структура SGSN человека была хорошо изучена. Иллюстративная структура доступна под кодом доступа PDB 4MHX. Также были описаны последовательности SGSN отличных от человека приматов, включая шимпанзе (запись UniProt K7C218). Последовательность SGSN мыши доступна под записью UniProt Q9EQ08. Вариант SGSN имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего SGSN дикого типа или его фрагмента, *например*, при анализе в идентичных условиях. Каталитически активный фрагмент SGSN имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного SGSN или его варианта, *например*, при анализе в идентичных условиях.

[0141] В контексте данного документа «кислая сфингомиелиназа», «сфингомиелин фосфодиэстераза» или «ASM» относится к сфингомиелин фосфодиэстеразе 1 (EC 3.1.4.12), которая представляет собой лизосомальный фермент, преобразующий сфингомиелин в церамид. Заболевания, связанные с дефицитом ASM, включают болезнь Ниманна - Пика (*например*, типа А или типа В). В контексте данного документа термин «ASM» как компонент белка, который содержит Fc-полипептид, является каталитически активным и включает функциональные варианты, в том числе аллельные варианты и сплайс-варианты, ASM дикого типа или его фрагмента. Последовательность изоформы 1 ASM человека, которая является человеческой последовательностью, считающейся канонической последовательностью, доступна под записью UniProt P17405 и кодируется геном SMPD1 человека в 11p15.4. Полноразмерная последовательность приведена как SEQ ID NO:121. В контексте данного документа «зрелая» последовательность ASM относится к форме полипептидной цепи, в которой отсутствует сигнальная последовательность полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность зрелого полипептида ASM человека приведена как SEQ ID NO:122, что соответствует аминокислотами 47-629 полноразмерной человеческой последовательности. В контексте данного документа «усеченная» последовательность ASM относится к каталитически активному фрагменту полноразмерной полипептидной

цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность типового усеченного полипептида ASM человека приведена как SEQ ID NO:123, что соответствует аминокислотами 47-620 полноразмерной человеческой последовательности. Структура ASM человека была хорошо изучена. Иллюстративная структура доступна под кодом доступа PDB 5I81. Также были описаны последовательности ASM отличных от человека приматов, включая шимпанзе (запись UniProt H2Q319). Последовательность ASM мыши доступна по записью Uniprot Q04519. Вариант ASM имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего ASM дикого типа или его фрагмента, *например*, при анализе в идентичных условиях. Каталитически активный фрагмент ASM имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного ASM или его варианта, *например*, при анализе в идентичных условиях.

[0142] «β-глюкоцереброзидаза» или «GBA» также известна как глюкозилцерамидаза (EC 3.2.1.45). В контексте данного документа этот термин относится к лизосомальному ферменту, который обладает активностью глюкозилцерамидазы и катализирует расщепление глюкозилцерамида до церамида и глюкозы. Дефицит GBA связан с болезнью Гоше или болезнью Паркинсона. В контексте данного документа термин «GBA» как компонент белка, который содержит Fc-полипептид, является каталитически активным и включает функциональные варианты, в том числе аллельные варианты и сплайс-варианты, GBA дикого типа или его фрагмента. Последовательность GBA человека, длинной изоформы, которая считается канонической последовательностью, доступна под записью UniProt P04062-1 и кодируется геном GBA человека в 1q22. Полноразмерная последовательность приведена как SEQ ID NO:93. В контексте данного документа «зрелая» последовательность GBA относится к форме полипептидной цепи, в которой отсутствует сигнальная и пропептидная последовательности полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Аминокислотная последовательность зрелого полипептида GBA человека приведена как SEQ ID NO:94, что соответствует аминокислотами 40-536 полноразмерной человеческой последовательности. В контексте данного документа «усеченная» последовательность GBA относится к каталитически активному фрагменту полноразмерной полипептидной цепи природного происхождения. Структура GBA человека была хорошо изучена. Доступно около 20 кристаллических структур GBA. Также были описаны последовательности GBA отличных от человека приматов, включая шимпанзе (запись UniProt Q9BDT0) и орангутана (запись UniProt Q5R8E3). Последовательность GBA мыши доступна по записью Uniprot P17439. Вариант GBA имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%,

по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего GBA дикого типа или его фрагмента, *например*, при анализе в идентичных условиях. Каталитически активный фрагмент GBA имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного GBA или его варианта, *например*, при анализе в идентичных условиях.

[0143] В контексте данного документа «трансферриновый рецептор» или «TfR» относится к белку 1 трансферринового рецептора. Полипептидная последовательность трансферринового рецептора человека 1 представлена в SEQ ID NO:96. Также известны последовательности белка 1 трансферринового рецептора других видов (*например*, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резус, NP_001244232.1; собаки, NP_001003111.1; крупного рогатого скота, NP_001193506.1; мыши, NP_035768.1; крысы, NP_073203.1; и курицы, NP_990587.1). Термин «трансферриновый рецептор» также охватывает аллельные варианты типовых референсных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе белка 1 трансферринового рецептора. Полноразмерный белок трансферринового рецептора содержит короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и крупный внеклеточный домен. Внеклеточный домен состоит из трех доменов: протеазоподобного домена, спирального домена и апикального домена. Последовательность апикального домена трансферринового рецептора человека 1 представлена в SEQ ID NO:238.

[0144] В контексте данного документа «слитый белок» или «слитый белок [ERT-фермент]-Fc» относится к димерному белку, содержащему первый Fc-полипептид, который связан (*например*, слит) с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом (*т. е.* «слитый полипептид [ERT]-Fc»); и второй Fc-полипептид, который образует Fc-димер с первым Fc-полипептидом. Второй Fc-полипептид также может быть связан (*например*, слит) с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом. Первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид могут быть связаны с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. Первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид могут представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом. Первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид могут представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые обеспечивают связывание с трансферриновым рецептором. Первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид могут представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые снижают эффекторную функцию.

Первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид могут представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые продлевают сывороточное время полужизни.

[0145] В контексте данного документа «слитый полипептид» или «слитый полипептид [ERT-фермент]-Fc» относится к Fc-полипептиду, который связан (*например*, слит) с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом. Fc-полипептид может быть связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. Fc-полипептид может представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом. Fc-полипептид может представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые обеспечивают связывание с трансферриновым рецептором. Fc-полипептид может представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые снижают эффекторную функцию. Fc-полипептид может представлять собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит одну или более модификаций, которые продлевают сывороточное время полужизни.

[0146] В контексте данного документа термин «Fc-полипептид» относится к C-концевой области полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина природного происхождения, который характеризуется свернутой структурой Ig как структурный домен. Fc-полипептид содержит последовательности константной области, содержащие по меньшей мере CH2-домен и/или CH3-домен, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области. В общем случае Fc-полипептид не содержит переменную область.

[0147] «Модифицированный Fc-полипептид» относится к Fc-полипептиду, который имеет по меньшей мере одну мутацию, *например*, замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью Fc-полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа, но сохраняет общую свернутую структуру Ig нативного Fc-полипептида.

[0148] Термин «FcRn» относится к неонатальному Fc-рецептору. Связывание Fc-полипептидов с FcRn снижает клиренс и повышает сывороточное время полужизни Fc-полипептида. Человеческий белок FcRn представляет собой гетеродимер, который состоит из белка размером около 50 кДа, сходного с белком главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класс I, и β 2-микроглобулина размером около 15 кДа.

[0149] В контексте данного документа «сайт связывания FcRn» относится к области Fc-полипептида, которая связывается с FcRn. В человеческом IgG сайт связывания в соответствии с системой нумерации EU содержит T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, T307, E380, M428, H433, N434, H435 и Y436. Эти позиции соответствуют позициям 20-26, 77, 150, 198 и 203-206 в SEQ ID NO:1.

[0150] В контексте данного документа «нативный сайт связывания FcRn» относится к области Fc-полипептида, которая связывается с FcRn и которая имеет такую

же аминокислотную последовательность, что и область Fc-полипептида природного происхождения, которая связывается с FcRn.

[0151] В контексте данного документа термины «СН3-домен» и «СН2-домен» относятся к полипептидам домена константной области иммуноглобулина. В целях данной заявки полипептид СН3-домена относится к сегменту из аминокислот от позиции около 341 до позиции около 447 согласно схеме нумерации EU, а полипептид СН2-домена относится к сегменту из аминокислот от позиции около 231 до позиции около 340 согласно схеме нумерации EU. Полипептиды СН2- и СН3-доменов также могут быть пронумерованы по схеме нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация СН2-домена соответствует 1-110, а нумерация СН3-домена соответствует 1-107, в соответствии с научной схемой нумерации IMGT (веб-сайт IMGT). СН2 и СН3-домены являются частью Fc-области иммуноглобулина. Fc-область относится к сегменту из аминокислот от позиции около 231 до позиции около 447 согласно схеме нумерации EU, но в контексте данного документа также может включать по меньшей мере часть шарнирной области антитела. Иллюстративная последовательность шарнирной области представляет собой шарнирную последовательность IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:95).

[0152] Термины «дикого типа», «нативный» и «природного происхождения» в отношении СН2 и СН3-домена используются в данном документе для обозначения домена, который имеет последовательность, которая встречается в природе.

[0153] В контексте данного документа термин «мутант» в отношении мутантного полипептида или мутантного полинуклеотида взаимозаменяемо используется с термином «вариант». Вариант в отношении данной референсной последовательности СН3- или СН2-домена дикого типа может включать аллельные варианты природного происхождения. СН3- или СН2-домен «неприродного происхождения» относится к вариантному или мутантному домену, который не присутствует в клетке в природе и который получен путем генетической модификации, *например*, с помощью технологии генной инженерии или технологий мутагенеза, полинуклеотида или полипептида нативного СН3-домена или СН2-домена. «Вариант» включает любой домен, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию относительно дикого типа. Мутации могут включать замены, вставки и делеции.

[0154] Термин «аминокислота» относится к аминокислотам природного происхождения и синтетическим аминокислотам, а также к аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют подобно аминокислотам природного происхождения.

[0155] Аминокислотами природного происхождения являются те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позже модифицируются, *например*, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. «Аминокислотные аналоги» относятся к соединениям, которые имеют такую же базовую химическую структуру, что и аминокислота природного происхождения, *т. е.*, α -углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, амино группу и R-группу, *например*,

гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (*например*, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же базовую химическую структуру, что и аминокислота природного происхождения. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно аминокислоте природного происхождения.

[0156] α -аминокислоты природного происхождения включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереоизомеры α -аминокислот природного происхождения включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser) D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации.

[0157] В данном документе аминокислоты могут быть обозначены общеизвестными трехбуквенными символами или однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[0158] Термины «полипептид» и «пептид» взаимозаменяемо используются в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующих аминокислот природного происхождения, а также к аминокислотным полимерам природного происхождения и к аминокислотным полимерам неприродного происхождения. Аминокислотные полимеры могут содержать исключительно L-аминокислоты, исключительно D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

[0159] В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду или димеру (*т. е.* из двух) или мультимеру (*т. е.* из трех или более) одноцепочечных полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, *например*, дисульфидной связью, или за счет нековалентных взаимодействий.

[0160] Термин «консервативная замена», «консервативная мутация» или «консервативно модифицированный вариант» относится к изменению, которое приводит к замене аминокислоты другой аминокислотой, которую можно отнести к категории, имеющей подобную характеристику. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определенных таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовая кислота или E), Asp (аспарагиновая кислота или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин

или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также могут быть определены подгруппы. Например, группу заряженных или полярных аминокислот можно подразделить на подгруппы, включающие: «положительно заряженную подгруппу», содержащую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», содержащую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», содержащую Asn и Gln. В другом примере ароматическую или циклическую группу можно подразделить на подгруппы, включающие: «подгруппу азотного кольца», содержащую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», содержащую Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическую группу можно подразделить на подгруппы, *например*, «алифатическую неполярную подгруппу», содержащую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», содержащую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в рамках указанных выше подгрупп, такие как, без ограничения: Lys на Arg или наоборот так, чтобы мог сохраняться положительный заряд; Glu на Asp или наоборот так, чтобы мог сохраняться отрицательный заряд; Ser на Thr или наоборот так, чтобы мог сохраняться свободный -ОН; и Gln на Asn или наоборот так, чтобы мог сохраняться свободный -NH₂. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты заменяют гидрофобной аминокислотой природного происхождения, *например*, в активном сайте, для сохранения гидрофобности.

[0161] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков, *например*, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в определенной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения, или обозначенной области, согласно определению с помощью алгоритма сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального осмотра.

[0162] В случае сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна аминокислотная последовательность служит референсной последовательностью, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить с помощью различных способов, доступных для специалиста в данной области техники, *например*, визуального выравнивания или с помощью общедоступного программного обеспечения, в котором используются известные алгоритмы для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Специалист в

данной области техники может определить параметры, используемые при выравнивании для достижения максимального выравнивания. Для сравнения полипептидных последовательностей в целях данной заявки применяют стандартный BLAST для белков в алгоритме BLASTP для выравнивания последовательностей двух белков с параметрами по умолчанию.

[0163] Термины «соответствующий», «определенный относительно» или «пронумерованный относительно», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной последовательности, относятся к позиции остатка конкретной референсной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с референсной последовательностью. Таким образом, например, аминокислотный остаток в модифицированном Fc-полипептиде «соответствует» аминокислоте в SEQ ID NO:1, когда остаток выравнивается с аминокислотой SEQ ID NO:1 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:1. Полипептид, который выровнен с референсной последовательностью, не обязательно должен иметь такую же длину, что и референсная последовательность.

[0164] В контексте данного документа «аффинность связывания» относится к силе нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, *например*, одним связывающим сайтом полипептида, и мишенью, *например*, трансферриновым рецептором, с которым он связывается. Таким образом, например, данный термин может относиться к взаимодействиям 1:1 между полипептидом и его мишенью, если иное не указано или не ясно из контекста. Аффинность связывания можно определить количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$, время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации ($k_{\text{асс}}$, время⁻¹ М⁻¹). K_D можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплекса, *например*, используя методы поверхностного плазмонного резонанса (ППР), *например*, систему Biacore™; анализ кинетического исключения, такой как KinExA®; и биослоевую интерферометрию (*например*, используя платформу ForteBio® Octet®). В контексте данного документа «аффинность связывания» включает не только формальную аффинность связывания, такую, которая отражает взаимодействия 1:1 между полипептидом и его мишенью, но также и кажущуюся аффинность, для которой рассчитывают значения K_D , которые могут отражать avidное связывание.

[0165] В контексте данного документа термин «специфически связывается» или «избирательно связывается» с мишенью, *например*, TfR, в отношении сконструированного TfR-связывающего полипептида, TfR-связывающего пептида или TfR-связывающего антитела, описанных в данном документе, относится к реакции связывания, в которой сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело связываются с мишенью с большей аффинностью, большей avidностью и/или в течение большего времени, чем они связываются с структурно отличной мишенью. В типовых вариантах осуществления сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело

имеют по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или более большую аффинность в отношении конкретной мишени, *например*, TfR, по сравнению с неродственной мишенью при анализе в одинаковых условиях аффинного анализа. В контексте данного документа термин «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «является специфическим в отношении» конкретной мишени (*например*, TfR) может быть проиллюстрирован, например, молекулой, имеющей равновесную константу диссоциации K_d в отношении мишени, с которой она связывается, составляющую, *например*, 10^{-4} М или менее, *например*, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело специфически связываются с эпитопом на TfR, который является консервативным между видами (*например*, структурно консервативным между видами), *например*, консервативным между видами отличных от человека приматов и человеком (*например*, структурно консервативным между видами отличных от человека приматов и человеком). В некоторых вариантах осуществления сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело могут связываться исключительно с человеческим TfR.

[0166] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в тяжелой цепи или легкой цепи антитела, который получен из генного сегмента вариабельной области (V), генного сегмента области разнообразия (D) или генного сегмента соединительной области (J) зародышевой линии (и не получен из генного сегмента константной области (C α и C δ)), и который придает антителу его специфичность в отношении связывания с антигеном. Как правило, вариабельная область антитела содержит четыре консервативные «каркасные» области, перемежающиеся тремя гипервариабельными «определяющими комплементарность областями».

[0167] Термины «антигенсвязывающая часть» и «антигенсвязывающий фрагмент» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном посредством вариабельной области. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются этим, фрагмент Fab (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области), одноцепочечный Fv (scFv), дисульфид-связанный Fv (dsFv), определяющие комплементарность области (CDR), VL (вариабельную область легкой цепи) и VH (вариабельную область тяжелой цепи).

[0168] Термины «лечение» и т. п. в общем случае используются в данном документе для обозначения получения необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта. «Лечение» может относиться к любым показателям успеха при лечении или уменьшении интенсивности лизосомной болезни накопления, *например*, синдрома Хантера, синдрома Санфилиппо А, болезни Ниманна - Пика, болезни Гоше или

болезни Паркинсона, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как уменьшение выраженности симптомов, ремиссия, улучшение выживаемости пациента, увеличение времени или уровня выживаемости, уменьшение интенсивности симптомов или повышение степени переносимости расстройства пациентом, замедление скорости дегенерации или ухудшения или улучшение физического или психического благополучия пациента. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не получающими лечение, или с тем же пациентом до лечения или в разное время в течение лечения.

[0169] Взаимозаменяемо используемые в данном документе термины «субъект», «индивид» и «пациент» относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, людей, отличных от человека приматов, грызунов (*например*, крыс, мышей и морских свинок), кроликов, коров, свиней, лошадей и другие виды млекопитающих. В одном варианте осуществления пациент представляет собой человека.

[0170] Термин «фармацевтически приемлемый наполнитель» относится к неактивному фармацевтическому ингредиенту, который является биологически или фармакологически совместимым для применения людьми или животными, такому как, без ограничения, буфер, носитель или консервант.

[0171] В контексте данного документа термины «терапевтическое количество», «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная концентрация» агента представляют количество или концентрацию агента, которые позволяют лечить признаки или симптомы заболевания (*например*, LSD) у субъекта (*например*, млекопитающего).

[0172] Термин «введение» относится к способу доставки агентов, соединений или композиций в необходимый участок биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, интрадермальную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку, толстокишечную доставку, ректальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления описанные в данном документе полипептиды вводят внутривенно.

Ферменты для ферментной заместительной терапии (ERT)

[0173] Лизосомные болезни накопления (LSD) представляют собой наследственные метаболические заболевания, характеризующиеся накоплением нерасщепляемых или частично расщепляемых макромолекул, что в конечном итоге приводит к клеточной дисфункции и клиническим аномалиям. Традиционно LSD определяются как дефициты лизосомальной функции, в общем случае классифицируемые по накапливаемому субстрату, и включают сфинголипидозы, олигосахаридозы, муколипидозы, мукополисахаридозы, болезни накопления липопротеинов, нейрональные цероидные липофузинозы и другие. Недавно классификацию этих расстройств расширили, чтобы включить другие дефициты или дефекты в белках, которые приводят к накоплению

макромолекул, таких как белки, необходимые для нормальной посттрансляционной модификации лизосомальных ферментов, или белки, важные для правильной лизосомальной миграции.

[0174] В некоторых аспектах описанный в данном документе белок содержит: (i) Fc-полипептид, который может содержать модификации (*например*, одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации) или может представлять собой Fc-полипептид дикого типа; и ERT-фермент; и (ii) Fc-полипептид, который может содержать модификации (*например*, одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации) или может представлять собой Fc-полипептид дикого типа; и, необязательно, ERT-фермент. В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида могут содержать модификации, которые приводят к связыванию с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), *например*, трансферриновым рецептором (TfR). ERT-фермент может представлять собой фермент, дефицит которого наблюдается при LSD. ERT-фермент, включенный в слитый белок, является каталитически активным, *т. е.* он сохраняет ферментативную активность, дефицит которой наблюдается при LSD. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS), дефицит которой наблюдается при синдроме Хантера. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), дефицит которой наблюдается при синдроме Санфилиппо. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой кислую сфингомиелиназу (ASM), дефицит которой наблюдается при болезни Ниманна - Пика. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой β -глюкоцереброзидазу (GBA), дефицит которой наблюдается при болезни Гоше и болезни Паркинсона.

[0175] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий ERT-фермент и, необязательно, модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ, *например*, TfR-связывающий Fc-полипептид, содержит каталитически активный фрагмент или вариант IDS дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент IDS представляет собой вариант или каталитически активный фрагмент белка IDS, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления каталитически активный вариант или фрагмент фермента IDS имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более активности фермента IDS дикого типа.

[0176] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий ERT-фермент и, необязательно, модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ, *например*, TfR-связывающий Fc-полипептид, содержит каталитически активный фрагмент или вариант SGSH дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH представляет собой вариант или каталитически активный

фрагмент белка SGSH, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:119 и 120. В некоторых вариантах осуществления каталитически активный вариант или фрагмент фермента SGSH имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более активности фермента SGSH дикого типа.

[0177] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий ERT-фермент и, необязательно, модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ, *например*, TfR-связывающий Fc-полипептид, содержит каталитически активный фрагмент или вариант ASM дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент ASM представляет собой вариант или каталитически активный фрагмент белка ASM, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:121, 122 и 123. В некоторых вариантах осуществления каталитически активный вариант или фрагмент фермента ASM имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более активности фермента ASM дикого типа.

[0178] В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий ERT-фермент и, необязательно, модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ, *например*, TfR-связывающий Fc-полипептид, содержит каталитически активный фрагмент или вариант GBA дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент GBA представляет собой вариант или каталитически активный фрагмент белка GBA, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:93 и 94. В некоторых вариантах осуществления каталитически активный вариант или фрагмент фермента GBA имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более активности фермента GBA дикого типа.

[0179] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ASM или GBA, или его каталитически активный вариант или фрагмент, который присутствует в описанном в данном документе слитом белке, сохраняет по меньшей мере 25% своей активности по сравнению с активностью, когда он не соединен с Fc-полипептидом или TfR-связывающим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент или его каталитически активный вариант или фрагмент сохраняет по меньшей мере 10% или по меньшей мере 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% своей активности по сравнению с активностью, когда он не соединен с Fc-полипептидом или TfR-связывающим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент или его каталитически активный вариант или фрагмент сохраняет по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% своей активности по сравнению с активностью, когда он не соединен с

Fc-полипептидом или TfR-связывающим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления слияние с Fc-полипептидом не снижает активность ERT-фермента, *например*, IDS, SGSH, ASM или GBA, или его каталитически активного варианта или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слияние с TfR-связывающим Fc-полипептидом не снижает активность ERT-фермента.

Модификации Fc-полипептида для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)

[0180] В некоторых аспектах в данном документе предложены слитые белки, которые могут переноситься через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Такой белок содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ. Рецепторы ГЭБ экспрессируются на эндотелии ГЭБ, а также в других типах клеток и тканей. В некоторых вариантах осуществления рецептор ГЭБ представляет собой трансферриновый рецептор (TfR).

[0181] Аминокислотные остатки, обозначенные в различных Fc-модификациях, включая внесенные в модифицированный Fc-полипептид, который связывается с ГЭБ, *например*, TfR, пронумерованы в данном документе по системе нумерации EU. Любой Fc-полипептид, *например*, Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, может иметь модификации, *например*, аминокислотные замены в одной или более позициях, как описано в данном документе.

[0182] Модифицированный (*например*, усиливающий гетеродимеризацию и/или связывание рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, может иметь по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью нативной Fc-области или ее фрагментом, *например*, фрагментом длиной по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот или более. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность нативной Fc-области представляет собой последовательность Fc-области SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 1-110 в SEQ ID NO:1 или с аминокислотами 111-217 в SEQ ID NO:1 или ее фрагменте, *например*, фрагменте длиной по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот или более.

[0183] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, усиливающий гетеродимеризацию и/или связывание рецептора ГЭБ) Fc-полипептид содержит по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более, или по меньшей мере 100 аминокислот или более, которые соответствуют аминокислотной последовательности нативной Fc-области. В некоторых

вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере 25 смежных аминокислот или по меньшей мере 30, 35, 40 или 45 смежных аминокислот, или 50 смежных аминокислот, или по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более смежных аминокислот, или 100 или более смежных аминокислот, которые соответствуют аминокислотной последовательности нативной Fc-области, такой как SEQ ID NO:1.

[0184] В некоторых вариантах осуществления домен, модифицированный в отношении активности связывания рецептора ГЭБ, представляет собой CH3-домен Ig человека, такой как CH3-домен IgG1. CH3-домен может принадлежать любому подтипу IgG, *т. е.* IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG1 CH3-домен относится к сегменту из аминокислот от позиции около 341 до позиции около 447 согласно схеме нумерации EU.

[0185] В некоторых вариантах осуществления домен, модифицированный в отношении активности связывания рецептора ГЭБ, представляет собой CH2-домен Ig человека, такой как CH2-домен IgG. CH2-домен может принадлежать любому подтипу IgG, *т. е.* IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG1 CH2-домен относится к сегменту из аминокислот от позиции около 231 до позиции около 340 согласно схеме нумерации EU.

[0186] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных позициях, включающих 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0187] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных позициях, включающих 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288, 289 и 290 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0188] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных позициях, включающих 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294, 296 и 300 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0189] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь,

восемь или девять замен в аминокислотных позициях, включающих 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0190] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть или семь замен в аминокислотных позициях, включающих 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 и 440 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0191] В некоторых вариантах осуществления модифицированный (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептид, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных позициях, включающих 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии со схемой нумерации EU.

FcRn-связывающие сайты

[0192] В определенных аспектах модифицированные (*например*, в отношении связывания рецептора ГЭБ) Fc-полипептиды или Fc-полипептиды, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, которые специфически не связываются с рецептором ГЭБ, также могут содержать FcRn-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий сайт находится в пределах Fc-полипептида или его фрагмента.

[0193] В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий сайт включает нативный FcRn-связывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий сайт не содержит аминокислотных изменений относительно аминокислотной последовательности нативного FcRn-связывающего сайта. В некоторых вариантах осуществления нативный FcRn-связывающий сайт представляется собой связывающий сайт IgG, *например*, связывающий сайт IgG человека. В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий сайт содержит модификацию, которая изменяет связывание FcRn.

[0194] В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий содержит один или более аминокислотных остатков, которые были мутированы, *например*, замещены, причем мутация(и) повышает(ют) сывороточное время полужизни или существенно не снижает(ют) сывороточное время полужизни (*т. е.* снижает(ют) сывороточное время полужизни не более чем на 25% по сравнению с противопоставляемым модифицированным Fc-полипептидом, содержащим остатки дикого типа в мутированных позициях, при анализе в одинаковых условиях). В некоторых вариантах осуществления FcRn-связывающий сайт содержит один или более аминокислотных остатков, которые были замещены в позициях 250-256, 307, 380, 428 и 433-436 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0195] В некоторых вариантах осуществления один или более остатков в или

вблизи FcRn-связывающего сайта мутированы относительно нативной последовательности IgG человека для продления сывороточного времени полужизни модифицированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления мутации введены в одну, две или три позиции 252, 254 и 256. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой M252Y, S254T, и T256E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит мутации M252Y, S254T и T256E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит замену в одной, двух или трех позициях T307, E380 и N434 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой T307Q, и N434A. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации T307A, E380A и N434A. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит замены в позициях T250 и M428 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации T250Q и/или M428L. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит замены в позициях M428 и N434 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации M428L и N434S. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутацию N434S или N434A.

Связывающие трансферриновый рецептор Fc-полипептиды

[0196] В этом разделе описано создание модифицированных Fc-полипептидов, описанных в данном документе, которые связываются с трансферриновым рецептором (TfR) и могут переноситься через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

TfR-связывающие Fc-полипептиды, содержащие мутации в CH3-домене

[0197] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит замены в CH3-домене. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит CH3-домен Ig человека, такой как CH3-домен IgG, который модифицирован в отношении TfR-связывающей активности. CH3-домен может принадлежать любому подтипу IgG, *т. е.* IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG CH3-домен относится к сегменту из аминокислот от позиции около 341 до позиции около 447 согласно схеме нумерации EU.

[0198] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, связывается с апикальным доменом TfR и может связываться с TfR без блокирования или какого-либо иного ингибирования связывания трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR существенно не ингибируется. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 50% (*например*, менее чем на около 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%). В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 20% (*например*, менее чем на около 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%,

8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%).

[0199] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в позициях 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные замены, которые можно вносить в этих позициях, приведены в Таблицах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 388 и/или 421 представляет собой ароматическую аминокислоту, *например*, Trp, Phe или Tyr. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 388 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe.

[0200] В некоторых вариантах осуществления замещена по меньшей мере одна из следующих позиций: Leu, Tyr, Met или Val в позиции 384; Leu, Thr, His или Pro в позиции 386; Val, Pro или кислая аминокислота в позиции 387; ароматическая аминокислота, *например*, Trp, в позиции 388; Val, Ser или Ala в позиции 389; кислая аминокислота, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro в позиции 413; Thr или кислая аминокислота в позиции 416; или Trp, Tyr, His или Phe в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях набора. Таким образом, Ile может находиться в позиции 384, 386 и/или позиции 413. В некоторых вариантах осуществления кислая аминокислота в позиции одной, двух или каждой из позиций 387, 413 и 416 представляет собой Glu. В других вариантах осуществления кислая аминокислота в позиции одной, двух или каждой из позиций 387, 413 и 416 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь позиций из 384, 386, 387, 388, 389, 413, 416 и 421 имеют аминокислотную замену, определенную в этом параграфе.

[0201] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, модифицированный как описано в предыдущих двух параграфах, содержит нативный Asp в позиции 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala или Asp в позиции 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 380, 391, 392 и 415 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Trp, Tyr, Leu или Gln могут находиться в позиции 380. В некоторых вариантах осуществления Ser, Thr, Gln или Phe могут находиться в позиции 391. В некоторых вариантах осуществления Gln, Phe или His могут находиться в позиции 392. В некоторых вариантах осуществления Glu может находиться в позиции 415.

[0202] В определенных вариантах осуществления модифицированный Fc-

полипептид содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или одиннадцать позиций, выбранных из нижеприведенных: Trp, Leu или Glu в позиции 380; Tyr или Phe в позиции 384; Thr в позиции 386; Glu в позиции 387; Trp в позиции 388; Ser, Ala, Val или Asn в позиции 389; Ser или Asn в позиции 390; Thr или Ser в позиции 413; Glu или Ser в позиции 415; Glu в позиции 416; и/или Phe в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит все одиннадцать позиций из нижеприведенных: Trp, Leu или Glu в позиции 380; Tyr или Phe в позиции 384; Thr в позиции 386; Glu в позиции 387; Trp в позиции 388; Ser, Ala, Val или Asn в позиции 389; Ser или Asn в позиции 390; Thr или Ser в позиции 413; Glu или Ser в позиции 415; Glu в позиции 416; и/или Phe в позиции 421.

[0203] В определенных вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Leu или Met в позиции 384; Leu, His или Pro в позиции 386; Val в позиции 387; Trp в позиции 388; Val или Ala в позиции 389; Pro в позиции 413; Thr в позиции 416; и/или Trp в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит Ser, Thr, Gln или Phe в позиции 391. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в позиции 380 и/или Gln, Phe или His в позиции 392. В некоторых вариантах осуществления Trp находится в позиции 380 и/или Gln находится в позиции 392. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид не содержит Trp в позиции 380.

[0204] В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Tyr в позиции 384; Thr в позиции 386; Glu или Val в позиции 387; Trp в позиции 388; Ser в позиции 389; Ser или Thr в позиции 413; Glu в позиции 416; и/или Phe в позиции 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит нативный Asn в позиции 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в позиции 380; и/или Glu в позиции 415. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит Trp в позиции 380; и/или Glu в позиции 415.

[0205] В дополнительных вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две или три замены в позициях, включающих 414, 424 и 426 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления позиция 414 представлена Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 424 представлена Ser, Thr, Glu или Lys; и/или позиция 426 представлена Ser, Trp или Gly.

[0206] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более из следующих замен: Trp в позиции 380; Thr в позиции 386; Trp в позиции 388; Val в позиции 389; Thr или Ser в позиции 413; Glu в позиции 415; и/или Phe в позиции 421 в соответствии со схемой нумерации EU.

[0207] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере

90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 111-217 любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислоты в позициях по нумерации EU 384-390 и/или 413-421 любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислоты в позициях по нумерации EU 380-390 и/или 413-421 любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислоты в позициях по нумерации EU 380-392 и/или 413-426 любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90).

[0208] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:4-90, 97-100 и 105-108 (*например*, SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90), и дополнительно содержит по меньшей мере пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать позиций, пронумерованных в соответствии со схемой EU, следующим образом: Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu в позиции 380; Leu, Tyr, Met или Val в позиции 384; Leu, Thr, His или Pro в позиции 386; Val, Pro или кислая аминокислота в позиции 387; ароматическая аминокислота, *например*, Trp, в позиции 388; Val, Ser или Ala в позиции 389; Ser or Asn в позиции 390; Ser, Thr, Gln или Phe в позиции 391; Gln, Phe или His в позиции 392; кислая аминокислота, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro в позиции 413; Lys, Arg, Gly или Pro в позиции 414; Glu или Ser в позиции 415; Thr или кислая аминокислота в позиции 416; Trp, Tyr, His или Phe в позиции 421; Ser, Thr, Glu или Lys в позиции 424; and Ser, Trp или Gly в позиции 426.

[0209] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

[0210] В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит дополнительные мутации, такие как мутации, описанные в разделе VI ниже, включая, но не ограничиваясь этим, мутацию типа «выступ» (*например*, T366W согласно нумерации EU), мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A,

L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) согласно нумерации EU), и/или мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L согласно схеме нумерации EU). В качестве иллюстрации, SEQ ID NO:156-229 представляют неограничивающие примеры модифицированных Fc-полипептидов с мутациями в CH3-домене (*например*, клоны CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2 и CH3C.35.23), содержащих одну или более из этих дополнительных мутаций.

[0211] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутацию типа «выступ» (*например*, T366W согласно нумерации EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:156, 168, 180, 192, 204 и 216. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:156, 168, 180, 192, 204 и 216.

[0212] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутацию типа «выступ» (*например*, T366W согласно нумерации EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) согласно нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:157, 158, 169, 170, 181, 182, 193, 194, 205, 206, 217, 218, 228 и 229. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:157, 158, 169, 170, 181, 182, 193, 194, 205, 206, 217 и 218.

[0213] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутацию типа «выступ» (*например*, T366W согласно нумерации EU) и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L согласно схеме нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:159, 171, 183, 195, 207 и 219. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:159, 171, 183, 195, 207 и 219.

[0214] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутацию типа «выступ» (*например*, T366W согласно нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) согласно нумерации EU), и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L согласно схеме нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из

SEQ ID NO:160, 161, 172, 173, 184, 185, 196, 197, 208, 209, 220 и 221. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:160, 161, 172, 173, 184, 185, 196, 197, 208, 209, 220 и 221.

[0215] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:162, 174, 186, 198, 210 и 222. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:162, 174, 186, 198, 210 и 222.

[0216] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) согласно нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:163, 164, 175, 176, 187, 188, 199, 200, 211, 212, 223 и 224. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:163, 164, 175, 176, 187, 188, 199, 200, 211, 212, 223 и 224.

[0217] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU) мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L согласно схеме нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:165, 177, 189, 201, 213 и 225. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:165, 177, 189, 201, 213 и 225.

[0218] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) согласно нумерации EU), и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L согласно схеме нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:166, 167, 178, 179, 190, 191, 202, 203, 214, 215, 226 и 227. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит последовательность любой из SEQ ID NO:166, 167, 178, 179, 190, 191, 202, 203, 214, 215,

226 и 227.

[0219] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь замен в позициях 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 и 440 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные модифицированные Fc-полипептиды представлены в SEQ ID NO:124-128. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Gly в позиции 437; Phe в позиции 438; и/или Asp в позиции 440. В некоторых вариантах осуществления Glu находится в позиции 440. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну замену из следующих: Phe или Ile в позиции 345; Asp, Glu, Gly, Ala или Lys в позиции 346; Tyr, Met, Leu, Ile или Asp в позиции 347; Thr или Ala в позиции 349; Gly в позиции 437; Phe в позиции 438; His Tyr, Ser или Phe в позиции 439; или Asp в позиции 440. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь позиций из 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 и 440 имеют замену, определенную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях в наборе.

[0220] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 111-217 любой из SEQ ID NO:124-128. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:124-128. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:124-128. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:124-128, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

TfR-связывающие Fc-полипептиды, содержащие мутации в CH2-домене

[0221] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит замены в CH2-домене. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит CH2-домен Ig человека, такой как CH2-домен IgG, который модифицирован в отношении TfR-связывающей активности. CH2-домен может принадлежать любому подтипу IgG, *т. е.* IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG CH2-домен относится к сегменту из аминокислот от позиции около 231 до позиции около 340 согласно схеме нумерации EU.

[0222] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, связывается с апикальным доменом TfR и может связываться с TfR без блокирования или какого-либо иного ингибирования связывания трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывания трансферрина с TfR существенно не ингибируется. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 50% (*например*, менее чем на около 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%). В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 20% (*например*, менее чем на около 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%).

[0223] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в позициях 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288 и 290 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные модифицированные Fc-полипептиды представлены в SEQ ID NO:129-133. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит Glu в позиции 287; и/или Trp в позиции 288. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну замену в одной из следующих позиций: Glu, Gly, Gln, Ser, Ala, Asn, Tyr или Trp в позиции 274; Ile, Val, Asp, Glu, Thr, Ala или Tyr в позиции 276; Asp, Pro, Met, Leu, Ala, Asn или Phe в позиции 283; Arg, Ser, Ala или Gly в позиции 285; Tyr, Trp, Arg или Val в позиции 286; Glu в позиции 287; Trp или Tyr в позиции 288; Gln, Tyr, His, Ile, Phe, Val или Asp в позиции 289; или Leu, Trp, Arg, Asn, Tyr или Val в позиции 290. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять позиций из 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288 и 290 имеют замену, определенную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях в наборе.

[0224] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Glu, Gly, Gln, Ser, Ala, Asn или Tyr в позиции 274; Ile, Val, Asp, Glu, Thr, Ala или Tyr в позиции 276; Asp, Pro, Met, Leu, Ala или Asn в позиции 283; Arg, Ser или Ala в позиции 285; Tyr, Trp, Arg или Val в позиции 286; Glu в позиции 287; Trp в позиции 288; Gln, Tyr, His, Ile, Phe или Val в позиции 289; и/или Leu, Trp, Arg, Asn или Tyr в позиции 290. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Arg в позиции 285; Tyr или Trp в позиции 286; Glu в позиции 287; Trp в позиции 288; и/или Arg или Trp в позиции 290.

[0225] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по

меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 1-110 любой из SEQ ID NO:129-133. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:129-133. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:129-133. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:129-133, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

[0226] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в позициях 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные модифицированные Fc-полипептиды представлены в SEQ ID NO:134-138. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Pro в позиции 270, Glu в позиции 295, и/или Tyr в позиции 297. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну замену в одной из следующих позиций: Pro, Phe, Ala, Met или Asp в позиции 266; Gln, Pro, Arg, Lys, Ala, Ile, Leu, Glu, Asp или Tyr в позиции 267; Thr, Ser, Gly, Met, Val, Phe, Trp или Leu в позиции 268; Pro, Val, Ala, Thr или Asp в позиции 269; Pro, Val или Phe в позиции 270; Trp, Gln, Thr или Glu в позиции 271; Glu, Val, Thr, Leu или Trp в позиции 295; Tyr, His, Val или Asp в позиции 297; Thr, His, Gln, Arg, Asn или Val в позиции 298; или Tyr, Asn, Asp, Ser или Pro в позиции 299. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все десять позиций из 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299 имеют замену, определенную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях в наборе.

[0227] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Pro, Phe или Ala в позиции 266; Gln, Pro, Arg, Lys, Ala или Ile в позиции 267; Thr, Ser, Gly, Met, Val, Phe или Trp в позиции 268; Pro, Val или Ala в позиции 269; Pro в позиции 270; Trp или Gln в позиции 271; Glu в позиции 295; Tyr в позиции 297; Thr, His или Gln в позиции 298; и/или Tyr, Asn, Asp или Ser в позиции 299.

[0228] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Met в позиции 266; Leu или Glu в позиции 267; Trp в позиции 268; Pro в позиции 269; Val в позиции 270; Thr в позиции 271; Val или Thr в позиции 295; His в позиции 197; His, Arg или Asn в позиции 198; и/или Pro в позиции 299.

[0229] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Asp в позиции 266; Asp в позиции 267; Leu в позиции 268; Thr в позиции 269; Phe в позиции 270; Gln в позиции 271; Val или Leu в позиции 295; Val в позиции 297; Thr в позиции 298; и/или Pro в позиции 299.

[0230] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 1-110 любой из SEQ ID NO:134-138. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:134-138. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:134-138. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:134-138, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

[0231] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в позициях 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294 и 300 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные модифицированные Fc-полипептиды представлены в SEQ ID NO:139-143. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну замену в одной из следующих позиций: Val or Asp в позиции 268; Pro, Met или Asp в позиции 269; Pro или Trp в позиции 270; Arg, Trp, Glu или Thr в позиции 271; Met, Tyr или Trp в позиции 272; Leu или Trp в позиции 292; Thr, Val, Ile или Lys в позиции 293; Ser, Lys, Ala или Leu в позиции 294; His, Leu или Pro в позиции 296; или Val или Trp в позиции 300. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все десять позиций из 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294 и 300 имеют замену, определенную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях в наборе.

[0232] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Val в позиции 268; Pro в позиции 269; Pro в позиции 270; Arg или Trp в позиции 271; Met в позиции 272; Leu в позиции 292; Thr в позиции 293; Ser в позиции 294; His в позиции 296; и/или Val в позиции 300.

[0233] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид

содержит Asp в позиции 268; Met или Asp в позиции 269; Trp в позиции 270; Glu или Thr в позиции 271; Tyr или Trp в позиции 272; Trp в позиции 292; Val, Ile или Lys в позиции 293; Lys, Ala или Leu в позиции 294; Leu или Pro в позиции 296; и/или Trp в позиции 300.

[0234] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 1-110 любой из SEQ ID NO:139-143. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:139-143. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:139-143. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:139-143, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

[0235] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в позициях 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331 в соответствии со схемой нумерации EU. Иллюстративные модифицированные Fc-полипептиды представлены в SEQ ID NO:144-148. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Trp в позиции 330. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит по меньшей мере одну замену в одной из следующих позиций: Trp, Val, Ile или Ala в позиции 272; Trp или Gly в позиции 274; Tyr, Arg или Glu в позиции 276; Ser, Arg или Gln в позиции 322; Val, Ser или Phe в позиции 324; Ile, Ser или Trp в позиции 326; Trp, Thr, Ser, Arg или Asp в позиции 329; Trp в позиции 330; или Ser, Lys, Arg или Val в позиции 331. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять позиций из 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331 имеют замену, определенную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид может содержать консервативную замену, *например*, аминокислоту из такой же группы заряда, группы гидрофобности, группы кольцевой структуры боковой цепи (*например*, ароматические аминокислоты) или группы размера, и/или полярной или неполярной группы, конкретной аминокислоты в одной или более позициях в наборе.

[0236] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять позиций, выбранных следующим образом: позиция 272 представляет собой Trp, Val, Ile или Ala; позиция 274 представляет собой Trp или Gly; позиция 276 представляет собой Tyr, Arg или Glu; позиция 322 представляет собой Ser, Arg или Gln; позиция 324 представляет собой Val, Ser или Phe; позиция 326 представляет собой Ile, Ser или Trp; позиция 329 представляет собой

Trp, Thr, Ser, Arg или Asp; позиция 330 представляет собой Trp; и позиция 331 представляет собой Ser, Lys, Arg или Val. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит Val или Ile в позиции 272; Gly в позиции 274; Arg в позиции 276; Arg в позиции 322; Ser в позиции 324; Ser в позиции 326; Thr, Ser или Arg в позиции 329; Trp в позиции 330; и/или Lys или Arg в позиции 331.

[0237] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотами 1-110 любой из SEQ ID NO:144-148. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:144-148. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:144-148. В других вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:144-148, но в которой заменены одна, две или три аминокислоты.

Дополнительные мутации Fc-полипептида

[0238] В некоторых аспектах описанный в данном документе слитый белок содержит два Fc-полипептида, каждый из которых может независимо содержать выбранные модификации или может представлять собой Fc-полипептид дикого типа, *например*, Fc-полипептид IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида содержат модификации, которые обеспечивают связывание с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), *например*, трансферриновым рецептором (TfR). Неограничивающие примеры других мутаций, которые можно вводить в один или оба Fc-полипептида, включают, *например*, мутации для увеличения сывороточной стабильности или сывороточного времени полужизни, для модуляции эффекторной функции, для влияния на гликозилирование, для снижения иммуногенности в организме человека и/или для обеспечения димеризации Fc-полипептидов по типу «выступ во впадину».

[0239] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептиды, присутствующие в слитом белке, независимо имеют идентичность аминокислотной последовательности, составляющую по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа (*например*, Fc-полипептидом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека).

[0240] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептиды, присутствующие в слитом белке, содержат мутации типа «выступ» и «впадина», чтобы стимулировать образование гетеродимеров и препятствовать образованию гомодимеров. В общем случае эти модификации приводят к появлению выпуклости («выступа») на контактной

поверхности первого полипептида и соответствующей выемки («впадины») на контактной поверхности второго полипептида таким образом, что выпуклость может располагаться в выемке, способствуя образованию гетеродимеров и препятствуя, таким образом, образованию гомодимеров. Выпуклости создают путем замены небольших аминокислотных боковых цепей на контактной поверхности первого полипептида более крупными боковыми цепями (*например*, тирозина или триптофана). Компенсирующие полости идентичного или сходного размера создают на контактной поверхности второго полипептида путем замещения крупных аминокислотных боковых цепей меньшими (*например*, аланина или треонина). В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные мутации находятся в позиции Fc-полипептида, которая не оказывает негативный эффект на связывание полипептида с рецептором ГЭБ, *например*, TfR.

[0241] В одном иллюстративном варианте осуществления подхода выступов и впадин для димеризации позиция 366 (в соответствии со схемой нумерации EU) одного из Fc-полипептидов, присутствующих в слитом белке, содержит триптофан на месте нативного треонина. Другой Fc-полипептид в димере имеет валин в позиции 407 (в соответствии со схемой нумерации EU) на месте нативного тирозина. Другой Fc-полипептид может дополнительно содержать замену, в которой нативный треонин в позиции 366 (в соответствии со схемой нумерации EU) замещен серином, а нативный лейцин в позиции 368 (в соответствии со схемой нумерации EU) замещен аланином. Таким образом, один из Fc-полипептидов описанного в данном документе слитого белка содержит мутацию T366W типа «выступ», а другой Fc-полипептид содержит мутацию Y407V, которая, как правило, идет в сопровождении мутаций T366S и L368A типа «впадина».

[0242] В некоторых вариантах осуществления можно вводить модификации для повышения сывороточного времени полужизни. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, содержат тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256 в соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба Fc-полипептида могут содержать замены M252Y, S254T и T256E. В альтернативном варианте один или оба Fc-полипептида могут содержать замены M428L и N434S в соответствии со схемой нумерации EU. В альтернативном варианте один или оба Fc-полипептида могут содержать замену N434S или N434A.

[0243] В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, могут содержать модификации, которые снижают эффекторную функцию, *т. е.* имеют сниженную способность индуцировать определенные биологические функции после связывания с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, которая опосредует эффекторную функцию. Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются этим, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ),

антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (АЗКФ), понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (*например*, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток. Эффекторные функции могут варьироваться в зависимости от класса антитела. Например, нативные человеческие антитела IgG1 и IgG3 могут обуславливать АЗКЦ и КЗЦ активность после связывания с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на клетке иммунной системы; а нативные человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 могут обуславливать функции АЗКФ после связывания с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на клетке иммунной системы.

[0244] В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, также могут быть сконструированы так, чтобы содержать другие модификации для гетеродимеризации, *например*, электростатическое конструирование контактных остатков в пределах контактной поверхности СНЗ-СНЗ, которые имеют естественный заряд, или модификации гидрофобных участков.

[0245] В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, могут содержать дополнительные модификации, которые модулируют эффекторную функцию.

[0246] В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, могут содержать модификации, которые снижают или устраняют эффекторную функцию. Иллюстративные мутации Fc-полипептида, которые снижают эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, замены в СН2-домене, *например*, в позициях 234 и 235, в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, содержат остатки аланина в позициях 234 и 235. Таким образом, один или оба Fc-полипептида могут содержать замены L234A и L235A (LALA)

[0247] Дополнительные мутации Fc-полипептида, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим следующие: позиция 329 может содержать мутацию, в которой пролин замещен глицином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно крупным, чтобы разрушить контактную поверхность Fc/Fc γ -рецептора, которая образуется между пролином 329 в Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 в Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D и P331S в соответствии со схемой нумерации EU. Также может присутствовать некоторое количество замен, *например*, L234A и L235A Fc-области IgG1 человека; L234A, L235A, и P329G Fc-области IgG1 человека; S228P и L235E Fc-области IgG4 человека; L234A и G237A Fc-области IgG1 человека; L234A, L235A, и G237A Fc-области IgG1 человека; V234A и G237A Fc-области IgG2 человека; L235A, G237A, и E318A Fc-области IgG4 человека; и S228P и L236E Fc-области IgG4 человека в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида могут содержать одну или более

аминокислотных замен, которые модулируют АЗКЦ, *например*, замены в позициях 298, 333 и/или 334, в соответствии со схемой нумерации EU.

Иллюстративные Fc-полипептиды, содержащие дополнительные мутации

[0248] В качестве неограничивающего примера, один или оба Fc-полипептида, присутствующие в описанном в данном документе слитом белке, могут содержать дополнительные мутации, в том числе мутацию типа «выступ» (*например*, T366W в соответствии со схемой нумерации EU), мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) в соответствии со схемой нумерации EU), и/или мутации, которые повышают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно системе нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L в соответствии со схемой нумерации EU).

[0249] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутацию типа «выступ» (*например*, T366W в соответствии со схемой нумерации EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутацию типа «выступ».

[0250] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутацию типа «выступ» (*например*, T366W в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутацию типа «выступ» и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

[0251] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутацию типа «выступ» (*например*, T366W в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно системе нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутацию типа «выступ» и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни.

[0252] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит мутацию типа «выступ» (*например*, T366W в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно системе нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутацию типа «выступ», мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни.

[0253] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V в соответствии со схемой нумерации EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутации типа «впадина».

[0254] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутации типа «впадина» и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

[0255] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно системе нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован

так, чтобы содержать мутации типа «впадина» и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни.

[0256] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина» (*например*, T366S, L368A и Y407V в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (*например*, L234A, L235A и/или P329G (*например*, L234A и L235A) в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни (*например*, (i) M252Y, S254T и T256E согласно системе нумерации EU, или (ii) N434S с или без M428L в соответствии со схемой нумерации EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:1, 4-90 и 124-148, может быть модифицирован так, чтобы содержать мутации типа «впадина», мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые увеличивают сывороточную стабильность или сывороточное время полужизни.

Иллюстративные слитые белки, содержащие ERT-фермент

[0257] В некоторых аспектах описанный в данном документе слитый белок содержит первый Fc-полипептид, который связан с ферментом для ферментной заместительной терапии (ERT), вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом; и второй Fc-полипептид, который образует Fc-димер с первым Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид не содержат последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой IDS, SGSH, ASM или GBA. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые снижают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые продлевают сывороточное время полужизни. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые обеспечивают связывание с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), *например*, трансферриновым рецептором (TfR).

[0258] В других аспектах описанный в данном документе слитый белок содержит первую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид,

который специфически связывается с рецептором ГЭБ, *например*, TfR, и вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, который димеризуется с модифицированным Fc-полипептидом с образованием Fc-димера. ERT-фермент может быть связан с первой или второй полипептидной цепью. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой IDS, SGSH, ASM или GBA. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан со второй полипептидной цепью. В некоторых вариантах осуществления белок содержит два ERT-фермента, каждый из которых связан с одной из полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может представлять собой связывающий рецептор ГЭБ полипептид, который специфически связывается с тем же рецептором ГЭБ, что и модифицированный Fc-полипептид в первой полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид не связывается специфически с рецептором ГЭБ.

[0259] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, и вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, причем модифицированный Fc-полипептид и Fc-полипептид димеризуются с образованием Fc-димера. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент представляет собой IDS, SGSH, ASM или GBA. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан с первой полипептидной цепью. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент связан со второй полипептидной цепью. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид не связывается специфически с рецептором ГЭБ, *например*, TfR.

[0260] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит первую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR и содержит замену T366W (типа «выступ»); и вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, содержащий замены T366S, L368A и Y407V (типа «впадина»). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены L234A и L235A (LALA). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены L234A и L235A (LALA) и замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид содержат остатки человеческого IgG1 дикого типа в позициях 234, 235, 252, 254, 256 и 366.

[0261] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «выступ», LALA и YTE, определенные для любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221, и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с соответствующей последовательностью; или содержит

последовательность любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит мутации типа «выступ», LALA и YTE, определенные для любой из SEQ ID NO:101-104, и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с соответствующей последовательностью; или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:101-104. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит любую из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221, а Fc-полипептид содержит любую из SEQ ID NO:101-104. В некоторых вариантах осуществления N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTNTPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:116, 228 и 229, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:116, 228 и 229.

[0262] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит первую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR и содержит замены T366S, L368A и Y407V (типа «впадина»); и вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, содержащий замену T366W (типа «выступ»). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены L234A и L235A (LALA). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид дополнительно содержат замены L234A и L235A (LALA) и замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид и/или Fc-полипептид содержат остатки человеческого IgG1 дикого типа в позициях 234, 235, 252, 254, 256 и 366.

[0263] В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит мутации типа «впадина», LALA и YTE, определенные для любой из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227, и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с соответствующей последовательностью; или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит мутации типа «выступ», LALA и YTE, определенные для любой из SEQ ID NO:109-112, и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности или по меньшей мере 95% идентичности с соответствующей последовательностью; или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:109-112. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит любую из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227, а Fc-полипептид содержит любую из SEQ ID

NO:109-112. В некоторых вариантах осуществления N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113).

[0264] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, связан с полипептидной цепью, которая содержит Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:101-104, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:101-104 (*например*, в виде слитого полипептида). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, связан с Fc-полипептидом линкером, таким как гибкий линкер, и/или шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность IDS, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления последовательность IDS, связанная с Fc-полипептидом, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:115, 117, 231, 232, 235 и 236 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:115, 117, 231, 232, 235 и 236. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность SGSH, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:120 или содержит последовательность SEQ ID NO:120. В некоторых вариантах осуществления последовательность SGSH, связанная с Fc-полипептидом, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:149 и 150 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:149 и 150. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит модифицированный Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221. В некоторых вариантах осуществления N-конец Fc-полипептида и/или модифицированного Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:116, 228 и 229, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:116, 228 и 229.

[0265] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:115, и модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:115, и

модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229.

[0266] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:231, и модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:231, и модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229.

[0267] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:235, и модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит слитый полипептид IDS-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:235, и модифицированный Fc-полипептид, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:169 и 229.

[0268] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, связан с полипептидной цепью, которая содержит Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:109-112, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:109-112 (*например*, в виде слитого полипептида). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, связан с Fc-полипептидом линкером, таким как гибкий линкер, и/или шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность IDS, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления последовательность IDS, связанная с Fc-полипептидом, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:118, 233 и 237 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:118, 233 и 237. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность SGSH, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:120 или содержит последовательность SEQ ID NO:120. В некоторых вариантах осуществления последовательность SGSH, связанная с Fc-полипептидом, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:152 и 153 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:152 и 153. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит модифицированный Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:105-

108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227. В некоторых вариантах осуществления N-конец Fc-полипептида и/или модифицированного Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113).

[0269] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, связан с полипептидной цепью, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:97-100, 151, 156-161, 168-173, 180-185, 192-197, 204-209 и 216-221 (*например*, в виде слитого полипептида). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, связан с модифицированным Fc-полипептидом линкером, таким как гибкий линкер, и/или шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность IDS, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность SGSH, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:120 или содержит последовательность SEQ ID NO:120. В некоторых вариантах осуществления последовательность SGSH, связанная с модифицированным Fc-полипептидом, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:154 и 155 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:154 и 155. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:101-104, 149 и 150 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:101-104, 149 и 150. В некоторых вариантах осуществления N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113).

[0270] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, присутствующий в описанном в данном документе слитом белке, связан с полипептидной цепью, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:105-108, 162-167, 174-179, 186-191, 198-203, 210-215 и 222-227 (*например*, в виде слитого полипептида). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, связан с модифицированным Fc-полипептидом линкером, таким как гибкий линкер, и/или

шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность IDS, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:114, 230 и 234. В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент содержит последовательность SGSH, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:120 или содержит последовательность SEQ ID NO:120. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:109-112 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:109-112. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность SGSH, связанную с Fc-полипептидом, имеющим по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:152 и 153 или содержащим последовательность любой из SEQ ID NO:152 и 153. В некоторых вариантах осуществления N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида содержит часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113).

Измерение кинетики связывания, аффинности, концентрации в головном мозге и действия на головной мозг

[0271] Описанные в данном документе слитые белки и другие композиции могут иметь широкий диапазон значений аффинности связывания. Например, в некоторых вариантах осуществления белок имеет аффинность в отношении рецептора гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), *например*, трансферринового рецептора (TfR), в любом диапазоне от 1 пМ до 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность в отношении TfR находится в диапазоне от 1 нМ до 5 мкМ или от 10 нМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность в отношении TfR находится в диапазоне от около 50 нМ до около 250 нМ.

[0272] В некоторых вариантах осуществления аффинность TfR-связывающего полипептида можно измерять в одновалентном формате. В других вариантах осуществления аффинность можно измерять в двухвалентном формате, *например*, в виде димера, содержащего слитый белок полипептид-Fab.

[0273] Способы анализа аффинности связывания, кинетики связывания и перекрестной реактивности для анализа связывания с рецептором ГЭБ, *например*, TfR, известны в данной области техники. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, методы твердофазного анализа связывания (*например*, ИФА), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (*например*, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), анализ кинетического исключения (*например*, KinExA®), проточную цитометрию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), биослоевую интерферометрию (*например*, Octet® (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)), и Вестерн-блот анализ. В некоторых вариантах осуществления ИФА применяют для определения

аффинности связывания и/или перекрестной реактивности. Способы проведения ИФА известны в данной области техники и также описаны в разделе Примеры ниже. В некоторых вариантах осуществления поверхностный плазмонный резонанс (ППР) применяют для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности. В некоторых вариантах осуществления анализ кинетического исключения применяют для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности. В некоторых вариантах осуществления биослоевую интерферометрию применяют для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности.

[0274] Неограничивающий пример способа определения аффинности связывания (*например*, в отношении TfR) описан в примере 13 ниже, в котором использовали инструмент Biacore™ для определения аффинности методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР - SPR). В этом способе представляющие интерес сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело захватывают на сенсорном чипе и проводят через сенсорный чип серийные разведения TfR при определенных скорости потока (*например*, 30 мкл/мин) и температуре (*например*, комнатной температуре). Анализ образцов проводят, используя определенные времена ассоциации и диссоциации (*например*, 45 и 180 секунд соответственно) с последующим восстановлением сенсорного чипа. Сигналы связывания корректируют путем вычитания измеренного сигнала из контрольного (*например*, используя нерелевантный IgG при такой же плотности), а значения аффинности в стационарном состоянии можно затем определить, используя программное обеспечение для построения зависимости равновесного сигнала от концентрации.

[0275] Концентрацию сконструированных TfR-связывающего полипептида, TfR-связывающего пептида, TfR-связывающего антитела или агента (*например*, связанного со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом) в головном мозге и/или плазме можно измерить, например, используя мышиную модель с нокином рецептора трансферрина человека (hTfR). Такую модель можно использовать для измерения и/или сравнения максимальной концентрации в головном мозге ($C_{\text{макс}}$) и/или действия на головной мозг, *например*, чтобы определить, повышается ли $C_{\text{макс}}$ и/или продлевается ли действие на головной мозг. Создание мышинной модели с нокином человеческого апикального TfR (TfR^{м/ч}) описано ниже в примере 12. Чтобы создать подходящую модель, можно использовать систему CRISPR/Cas9 для создания мышей, экспрессирующих апикальный домен человеческого Tfrc в гене Tfrc (*например*, в котором экспрессия *in vivo* находится под управлением эндогенного промотора). В частности, Cas9, одиночные направляющие РНК и донорскую ДНК (*например*, кодирующую последовательность человеческого апикального домена, которая была кодон-оптимизирована для экспрессии в организме мышей) можно вносить в эмбрионы мышей (*например*, путем пронуклеарной инъекции). Затем эмбрионы можно прививать псевдобеременным самкам. Самца-родоначальника из потомства самки,

которой привили эмбрионы, можно скрещивать с самками дикого типа для создания гетерозиготных мышей F1. После этого, путем скрещивания гетерозиготных мышей поколения F1 можно создавать гомозиготных мышей.

[0276] Для оценки концентрации в головном мозге и/или плазме или действия на головной мозг сконструированных TfR-связывающего полипептида, TfR-связывающего пептида, TfR-связывающего антитела или агента (*например*, связанного со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом) сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело (*например*, связанные с агентом) можно вводить мышинной модели (*например*, TfR^{M/C}). Образцы плазмы можно получать от мышей через необходимый период времени с последующей перфузией сосудистой системы подходящим раствором. После перфузии можно экстрагировать головной мозг (или его части), гомогенизировать и лизировать. Затем можно определять концентрации агента в плазме и/или лизате головного мозга, используя стандартные способы, хорошо известные специалисту в данной области техники. В качестве неограничивающего примера, для измерения концентраций можно применять анализ на основе ИФА, описанный в примере 3. Вкратце, концентрацию агента, сконструированных TfR-связывающего полипептида, TfR-связывающего пептида, TfR-связывающего антитела (*например*, в плазме или лизате) можно количественно определять, используя «сэндвич»-ИФА. Захватывающее антитело (*например*, анти-Fc захватывающее антитело) можно наносить на планшет (*например*, 384-луночный планшет MaxiSorp™) в необходимой концентрации (*например*, около 3 мкг/мл). Планшет блокируют (*например*, 5% БСА), а затем инкубируют с разведенной плазмой (*например*, 1:1000 или 1:10000). После этого добавляют антитело для обнаружения в необходимой концентрации (*например*, около 0,5 мкг/мл) и после него - вторичное антитело, такое как антикозье конъюгированное с HRP антитело. Затем в планшетах проводят реакцию (*например*, используя субстрат ТМБ), останавливают (*например*, серной кислотой) и измеряют поглощение на соответствующей длине волны (*например*, 450 нм) на планшет-ридере (*например*, планшет-ридере BioTek). Стандартные кривые можно строить, используя соответствующие (*например*, 4-кратные) серийные разведения, и аппроксимировать, используя алгоритм, такой как четырехпараметрическая логистическая регрессия.

[0277] Стандартную кривую можно построить путем введения некоторого диапазона доз мышинной модели с нокином. Путем введения мышинной модели с нокином агента, связанного с разными сконструированными TfR-связывающими полипептидами, TfR-связывающими пептидами, TfR-связывающими антителами (*например*, имеющими разную аффинность к TfR), или агента, связанного с референсным полипептидом или белком (*например*, который имеет более слабую аффинность в отношении TfR, чем представляющий интерес полипептид или белок), можно делать сравнения относительно эффекта сконструированных TfR-связывающих полипептидов, TfR-связывающих пептидов, TfR-связывающих антител на действие агента на головной мозг и/или на

значения $C_{\text{макс}}$ агента в головном мозге.

ERT-ферменты, связанные с Fc-полипептидами

[0278] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит два Fc-полипептида, описанных в данном документе, а один или оба Fc-полипептида могут дополнительно содержать частичную или полную шарнирную область. Шарнирная область может быть получена из любого подкласса или изотипа иммуноглобулина. Иллюстративной шарнирной областью иммуноглобулина является шарнирная область IgG, такая как шарнирная область IgG1, *например*, аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:95) или ее часть (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область находится в N-конце Fc-полипептида.

[0279] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид соединен с ERT-ферментом линкером, *например*, пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид соединен с ERT-ферментом пептидной связью или пептидным линкером, *например*, представляет собой слитый полипептид. Пептидный линкер может иметь такую конфигурацию, которая обеспечивает возможность вращения ERT-фермента относительно Fc-полипептида, с которым он соединен; и/или устойчивость к расщеплению протеазами. Пептидные линкеры могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может быть гибким линкером, *например*, содержащим аминокислоты, такие как Gly, Asn, Ser, Thr, Ala и т. п. Такие линкеры конструируют, используя известные параметры, и они могут иметь любую длину и содержать любое число повторяющихся единиц любой длины (*например*, повторяющихся единиц из остатков Gly и Ser). Например, линкер может содержать повторы, например, два, три, четыре, пять или более повторов Gly₄-Ser (SEQ ID NO:239) или один Gly₄-Ser (SEQ ID NO:239). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать сайт расщепления протеазами, *например*, который расщепляется ферментом, присутствующим в центральной нервной системе.

[0280] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент соединен с N-концом Fc-полипептида, *например*, линкером Gly₄-Ser (SEQ ID NO:239) или линкером (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать шарнирную последовательность или частичную шарнирную последовательность в N-конце, которая соединена с линкером или непосредственно соединена с ERT-ферментом.

[0281] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент соединен с C-концом Fc-полипептида, *например*, линкером Gly₄-Ser (SEQ ID NO:239) или линкером (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:240). В некоторых вариантах осуществления C-конец Fc-полипептида непосредственно соединен с ERT-ферментом.

[0282] В некоторых вариантах осуществления ERT-фермент соединен с Fc-полипептидом химическим перекрестно-сшивающим агентом. Такие конъюгаты можно создавать, используя хорошо известные химические реагенты и протоколы для

перекрестного сшивания. Например, существует большое число химических перекрестно-сшивающих агентов, которые известны специалистам в данной области техники и пригодны для перекрестного сшивания полипептида с представляющим интерес агентом. Например, перекрестно-сшивающие агенты представляют собой гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие агенты, которые можно применять для поэтапного связывания молекул. Гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие линкеры дают возможность разрабатывать более специфические способы связывания для конъюгации белков, тем самым снижая появление нежелательных побочных реакций, таких как гомобелковые полимеры. В данной области техники известен широкий ряд гетеробифункциональных перекрестно-сшивающих линкеров, включая N-гидроксисукцинимид (NHS) или его водорастворимый аналог N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS); N-сукцинимидил (4-йодоацетил)аминобензоат (SIAB), сукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутират (SMPB), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC); 4-сукцинимидилоксикарбонил-а-метил-а-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)пропионат]гексаноат (LC-SPDP). Те перекрестно-сшивающие агенты, которые имеют N-гидроксисукцинимидные фрагменты, можно получать в виде аналогов N-гидроксисульфосукцинимидов, которые обычно имеют более высокую растворимость в воде. Кроме того, те перекрестно-сшивающие агенты, которые имеют дисульфидные мостики в связывающей цепи, вместо этого можно синтезировать как алкильные производные, чтобы уменьшить уровень расщепления линкера *in vivo*. В дополнение к гетеробифункциональным перекрестным линкерам существует ряд других перекрестно-сшивающих агентов, включая гомобифункциональные и фотореактивные перекрестные линкеры. Дисукцинимидил субкрат (DSS), бисмалеимидогексан (BMH) и диметилпимелимидат 2HCl (DMP) являются примерами пригодных гомобифункциональных перекрестно-сшивающих агентов, а бис-[B-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED) и N-сукцинимидил-6 (4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (SANPAH) являются примерами пригодных фотореактивных перекрестных линкеров.

Оценка белковой активности

[0283] Активность описанных в данном документе слитых белков, которые содержат ERT-фермент, такой как, *например*, IDS, SGSH, ASM или GBA, можно оценивать разными методами анализа, включая методы анализа, в которых измеряется активность *in vitro* с применением искусственного субстрата, такие как описаны в разделе Примеры. Иллюстративный протокол для измерения активности IDS *in vitro* приведен в примере 2. Иллюстративный протокол для измерения активности ASM *in vitro* приведен в примере 5. Иллюстративные протоколы для измерения активности SGSH *in vitro* приведены в примерах 7 и 8.

[0284] В некоторых аспектах активность IDS оценивают, проводя анализ образца, такого как клеточный образец, тканевый образец или образец жидкости (*например*, ЦСЖ или мочи), в отношении количества гликозаминогликанов (GAG) гепаран- и дерматансульфата, которые накапливаются в результате дефицита IDS. Количество гепаран- и дерматансульфата определяют путем расщепления GAG, присутствующих в образце, гепариназой и хондроитиназой. Затем полученные в результате дисахариды можно анализировать методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС). Образцы с высоким уровнем накопления гепаран- и дерматансульфата будут иметь повышенные количества полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов. Таким образом, уровень дисахаридов обратно пропорционален ферментативной активности IDS.

[0285] Анализ методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС) можно проводить для любого образца, в котором накапливаются GAG, включая клеточные образцы, тканевые образцы и образцы жидкости. Такие образцы можно оценивать, чтобы отслеживать активность описанного в данном документе IDS-содержащего белка, *например*, который вводят в клетки *in vitro*, или, в некоторых вариантах осуществления, вводят субъекту *in vivo*. Субъект может представлять собой любое животное, такое как грызун, *например*, мышь, или отличный от человека примат. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом-человеком, таким как пациент, имеющий синдром Хантера, который проходит лечение IDS-терапией, при этом анализ используют для отслеживания активности IDS у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек проходит лечение слитым белком, описанным в данном документе.

[0286] В случае клеточных образцов, таких как образцы клеток или тканей, анализ включает разрушение клеток и вскрытие микровезикул. Разрушение клеток или вскрытие микровезикул можно обеспечить, используя замораживание-размораживание и/или обработку ультразвуком для получения экстракта (*например*, клеточного экстракта), содержащего GAG. Затем GAG подвергают обработке гепариназами (*например*, любыми описанными в данном документе) и хондроитиназой, которые разрушают GAG гепарансульфата и дерматансульфата. После расщепления получают супернатант, содержащий дисахариды GAG, а дисахаридные продукты анализируют методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС). Иллюстративный протокол приведен в примере 2.

[0287] В некоторых вариантах осуществления образец клеток, подлежащий анализу в отношении активности IDS, промывают и замораживают. Клеточный осадок обрабатывают ультразвуком в буфере для расщепления дисахаридов. Затем необходимое количество общего белка из обработанного ультразвуком образца добавляют в буфер для расщепления, содержащий гепариназу I, гепариназу II, гепариназу III и хондроитиназу B, последняя из которых специфична в отношении дерматансульфата. После расщепления, *например*, в течение около 3 часов при 30 °C, ферменты дезактивируют с помощью ЭДТК и кипячения. Затем образец центрифугируют, *например*, при 16000 x G, а супернатант переносят на центрифужный фильтр и центрифугируют при около 14000 x G. Затем

дисахариды ресуспендируют в смеси аналитического буфера и ацетонитрила в соотношении 1:1 об./об. и дополнительно анализируют методом жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией с электрораспылением, *например*, как описано в примере 2. Полученные из GAG дисахаридные продукты можно идентифицировать на основании времени удержания по сравнению с коммерчески доступными референсными стандартами. Иллюстративные полученные из гепарансульфата дисахариды включают D0S0 и D2S0 (номенклатура в соответствии с Lawrence et al., Nat. Methods, 5:291-292 (2008)).

[0288] В других аспектах активность SGSN оценивают, проводя анализ образца, такого как клеточный образец или тканевый образец, в отношении количества гликозаминогликанов (GAG) гепарансульфата, которые накапливаются в результате дефицита SGSN. Количество гепарансульфата определяют путем расщепления GAG, присутствующих в образце, гепариназой (*например*, любой описанной в данном документе). Затем полученные в результате дисахариды можно анализировать методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС). Образцы с высоким уровнем накопления гепарансульфата будут иметь повышенные количества полученных из гепарансульфата дисахаридов. Таким образом, уровень дисахаридов обратно пропорционален ферментативной активности SGSN.

[0289] Анализ методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС) можно проводить для любого образца, в котором накапливаются GAG, включая клеточные образцы, тканевые образцы и образцы жидкости. Такие образцы можно оценивать, чтобы отслеживать активность описанного в данном документе SGSN-содержащего белка, *например*, который вводят в клетки *in vitro*, или, в некоторых вариантах осуществления, вводят субъекту *in vivo*. Субъект может представлять собой любое животное, такое как грызун, *например*, мышь, или отличный от человека примат. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом-человеком, таким как пациент, имеющий синдром Санфилиппо А, который проходит лечение SGSN-терапией, при этом анализ используют для отслеживания активности SGSN у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек проходит лечение слитым белком, описанным в данном документе.

[0290] В случае клеточных образцов, таких как образцы клеток или тканей, анализ включает разрушение клеток и/или вскрытие микровезикул. Разрушение клеток или вскрытие микровезикул можно обеспечить, используя замораживание-размораживание и/или обработку ультразвуком для получения экстракта (*например*, клеточного экстракта), содержащего GAG. Затем GAG подвергают обработке гепариназами (*например*, любыми описанными в данном документе), которые разрушают GAG гепарансульфата. После расщепления получают супернатант, содержащий дисахариды GAG, а дисахаридные продукты анализируют методом масс-спектрометрии (*например*, ЖХ-МС/МС). Иллюстративный протокол приведен в примере 7.

[0291] В некоторых вариантах осуществления образец клеток, подлежащий анализу

в отношении активности SGSH, промывают и замораживают. Клеточный осадок обрабатывают ультразвуком в буфере для расщепления дисахаридов. Затем необходимое количество общего белка из обработанного ультразвуком образца добавляют в буфер для расщепления, содержащий гепариназу I, гепариназу II и/или гепариназу III. После расщепления, *например*, в течение около 3 часов при 30 °C, ферменты дезактивируют с помощью ЭДТК и кипячения. Затем образец центрифугируют, *например*, при 16000 x G, а супернатант переносят на центрифужный фильтр и центрифугируют при около 14000 x G. Затем дисахариды ресуспендируют в смеси аналитического буфера и ацетонитрила в соотношении 1:1 об./об. и дополнительно анализируют методом жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией с электрораспылением, *например*, как описано в примере 7. Полученные из GAG дисахаридные продукты можно идентифицировать на основании времени удержания по сравнению с коммерчески доступными референсными стандартами. Иллюстративные полученные из гепарансульфата дисахариды включают D0S0 и D2S0 (номенклатура в соответствии с Lawrence et al., Nat. Methods, 5:291-292 (2008)).

[0292] В некоторых вариантах осуществления оценивают образец ткани. Образец ткани можно оценивать, используя описанный в данном документе анализ, за исключением того, что несколько циклов замораживания-размораживания, *например*, 2, 3, 4, 5 или более, как правило, включают до этапа обработки ультразвуком, чтобы гарантировать вскрытие везикул.

[0293] Образцы, которые можно оценивать описанными в данном документе методами анализа, включают головной мозг, печень, почки, легкие, селезенку, плазму, сыворотку, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и мочу. В некоторых вариантах осуществления можно оценивать образцы ЦСЖ от пациента, получающего слитый белок фермент-Fc (*например*, слитый белок IDS-Fc или SGSH-Fc), описанный в данном документе.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

[0294] Полипептидные цепи, содержащиеся в слитых беках, описанных в данном документе, как правило, получают с помощью рекомбинантных способов. Соответственно, в некоторых аспектах в данном изобретении предложены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из полипептидных цепей, содержащих Fc-полипептиды, описанные в данном документе, и клетки-хозяева, в которые внесены нуклеиновые кислоты, которые используются для репликации кодирующих полипептид нуклеиновых кислот и/или для экспрессии полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, *например*, клеткой человека.

[0295] В другом аспекте предложены полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептидные цепи, описанные в данном документе. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет

собой ДНК. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой кДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой РНК.

[0296] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включен в конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой способный к репликации вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из плазмиды, вирусного вектора, фагамиды, дрожжевого хромосомного вектора и неэписомального вектора млекопитающих.

[0297] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. В одной серии вариантов осуществления экспрессионные конструкции нуклеиновых кислот адаптированы для применения в качестве библиотеки поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления библиотека адаптирована для поверхностной экспрессии в дрожжах. В некоторых вариантах осуществления библиотека адаптирована для поверхностной экспрессии в фаге. В другой серии вариантов осуществления экспрессионные конструкции нуклеиновых кислот адаптированы для экспрессии полипептида в системе, которая позволяет выделять полипептид в количестве миллиграммов или граммов. В некоторых вариантах осуществления система представляет собой экспрессионную систему клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления система представляет собой экспрессионную систему дрожжевых клеток.

[0298] Экспрессионные носители для выработки рекомбинантного полипептида включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды, полученные из pBR322, плазмиды, полученные из pEMBL, плазмиды, полученные из pEX, плазмиды, полученные из pVtas, и плазмиды, полученные из pUC, для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*. Векторы, полученные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg, являются примерами экспрессионных векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. В альтернативном варианте для временной экспрессии полипептидов в эукариотических клетках можно использовать производные вирусов, таких как вирус бычьей папилломы (BPV-1) или вирус Эпштейна - Барр (pHEBo, полученный из pREP, и p205). В некоторых вариантах осуществления может возникать необходимость экспрессировать рекомбинантный полипептид с помощью бакуловирусной экспрессионной системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессионных систем включают векторы, полученные из pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы, полученные из pAcUW (такие как pAcUW1), и векторы, полученные из pBlueBac. Дополнительные экспрессионные системы включают экспрессионные системы на основе аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и других вирусов.

[0299] Векторы можно трансформировать в любую подходящую клетку-хозяина. В

некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, *например*, клетки бактерий или дрожжей, можно адаптировать для применения в качестве библиотеки поверхностной экспрессии. В некоторых клетках векторы экспрессируют в клетках-хозяевах для экспрессии относительно больших количеств полипептида. Такие клетки-хозяева включают клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых и прокариотические клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки NS0, клетки Y0, клетки HEK293, клетки COS, клетки Vero или клетки HeLa.

[0300] Клетку-хозяина, трансфицированную экспрессионным вектором, кодирующим одну или более цепей Fc-полипептидов, описанных в данном документе, можно культивировать в соответствующих условиях, чтобы обеспечить экспрессию одного или более полипептидов. Полипептиды можно секретировать и выделять из смеси клеток и среды, содержащей такие полипептиды. В альтернативном варианте полипептиды можно оставлять в цитоплазме или в мембранной фракции, а клетки собирать, лизировать и выделять полипептид, используя необходимый способ.

Терапевтические способы

[0301] Слитый белок или агент (*например*, терапевтический агент), связанный со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, описанными в данном документе, можно использовать терапевтически для лечения LSD. В некоторых вариантах осуществления пациента, имеющего синдром Хантера, лечат слитым белком или агентом, связанным со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, которые содержат IDS. В некоторых вариантах осуществления пациента, имеющего синдром Санфилиппо А, лечат слитым белком или агентом, связанным со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, которые содержат SGSH. В некоторых вариантах осуществления пациента, имеющего болезнь Ниманна - Пика, лечат слитым белком или агентом, связанным со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, которые содержат ASM. В некоторых вариантах осуществления пациента, имеющего болезнь Гоше или болезнь Паркинсона, лечат слитым белком или агентом, связанным со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, которые содержат GBA.

[0302] Описанный в данном документе слитый белок, который содержит ERT-фермент, *например*, IDS, SGSH, ACM или GBA, вводят субъекту в терапевтически эффективных количестве или дозе. Иллюстративные дозировки включают суточную дозу в диапазоне от около 0,01 мг/кг до около 500 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 200 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 100 мг/кг, или от около 10 мг/кг до около 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления белок имеет ферментативную активность,

составляющую по меньшей мере около 500 единиц (Е)/мг, около 1,000 Е/мг или по меньшей мере около 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 Е/мг. В некоторых вариантах осуществления ферментативная активность составляет по меньшей мере около 11000 Е/мг или по меньшей мере около 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000 или 50000 Е/мг; или любое значение в диапазоне от около 500 Е/мг до около 50000 Е/мг. При этом дозировки могут варьироваться в соответствии с несколькими факторами, включая выбранный путь введения, состав композиции, ответ пациента, тяжесть патологического состояния, массу субъекта и решение лечащего врача. Со временем дозировку можно повышать или снижать согласно необходимости в случае индивидуального пациента. В некоторых вариантах осуществления пациенту сначала дают низкую дозу, которую затем повышают до эффективной дозировки, переносимой пациентом. Определение эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области техники.

[0303] В различных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления белок вводят внутривенно. Внутривенное введение можно проводить посредством инфузии, *например*, в течение периода от около 10 до около 30 минут, или в течение периода, составляющего по меньшей мере 1 час, 2 часа или 3 часа. В некоторых вариантах осуществления белок вводят в виде внутривенной болюсной инъекции. Также можно использовать комбинации инфузии и болюсного введения.

[0304] В некоторых парентеральных вариантах осуществления слитый белок или агент (*например*, терапевтический агент), связанный со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, вводят внутрибрюшинно, подкожно, интрадермально или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления белок или агент, связанный со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, вводят интрадермально или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления белок или агент, связанный со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, вводят интратекально, *например*, посредством эпидурального введения, или интрацеребровентрикулярно.

[0305] В других вариантах осуществления слитый белок или агент (*например*, терапевтический агент), связанный со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом, можно вводить перорально, посредством ингаляционного введения, интраназального введения, внутриглазного введения или местного введения. Также можно применять ингаляционное введение, *например*, посредством использования ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным агентом.

Способы замещения белков

[0306] В других аспектах в данном документе предложен способ переноса агента (*например*, агента, применимого для лечения лизосомной болезни накопления (LSD)) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления способ включает воздействие на ГЭБ полипептида или белка, который связывается (*например*, специфически связывается) с трансферриновым рецептором (TfR) с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связан с агентом и переносит связанный агент через ГЭБ. В некоторых вариантах осуществления улучшается (*например*, повышается) максимальная концентрация ($C_{\text{макс}}$) агента в головном мозге млекопитающего.

[0307] В других аспектах в данном документе предложен способ лечения LSD. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение млекопитающему полипептида или белка, который связывается (*например*, специфически связывается) с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связан с агентом для лечения LSD, тем самым обеспечивая действие агента на головной мозг млекопитающего.

[0308] В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связывается (*например*, специфически связывается) с TfR с аффинностью около 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связывается с TfR с аффинностью от около 100 нМ до около 200 нМ или от около 110 нМ до около 150 нМ.

[0309] В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок (*например*, связанный с агентом) улучшает (*например*, повышает) $C_{\text{макс}}$ агента в головном мозге по сравнению с агентом, связанным с референсным полипептидом или белком, который связывается (*например*, специфически связывается) с TfR с меньшей аффинностью.

[0310] В некоторых вариантах осуществления $C_{\text{макс}}$ агента в головном мозге улучшается (*например*, повышается) по меньшей мере в около 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2 раза, 2,2 раза, 2,4 раза, 2,6 раза, 2,8 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или более по сравнению с агентом, связанным с референсным полипептидом или белком (*например*, который связывается с TfR с меньшей аффинностью).

[0311] В некоторых вариантах осуществления на головной мозг млекопитающего действует агент в терапевтически эффективной концентрации (*например*, концентрации, достаточной для лечения одного или более признаков LSD) в течение меньшего времени по сравнению с агентом, который связан с референсным полипептидом или белком. В некоторых вариантах осуществления длительность воздействия на головной мозг уменьшается по меньшей мере на около 5%, 10%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95% или 98%.

[0312] В некоторых вариантах осуществления воздействие на головной мозг количественно оценивают путем построения зависимости воздействия на головной мозг (*например*, концентрации агента в головном мозге) как функции времени и вычисления

площади под кривой (ППК). Снижение ППК может представлять снижение или уменьшение воздействия на головной мозг. В некоторых вариантах осуществления длительность воздействия агента на головной мозг (*например*, в терапевтически эффективной концентрации) уменьшается.

[0313] В некоторых вариантах осуществления референсный полипептид или белок связывается (*например*, специфически связывается) с TfR с аффинностью, которая равна или меньше чем около 250 нМ, 300 нМ, 350 нМ, 400 нМ, 450 нМ, 500 нМ, 550 нМ или 600 нМ. В некоторых вариантах осуществления референсный полипептид или белок связывается с TfR с аффинностью, которая равна или меньше чем около 600 нМ.

[0314] В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой примата (*например*, человека). В некоторых вариантах осуществления человек представляет собой пациента, нуждающегося в лечении LSD. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет один или более признаков или симптомов LSD.

[0315] В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связывается (*например*, специфически связывается) с TfR примата. В некоторых вариантах осуществления TfR примата представляет собой TfR человека. В некоторых вариантах осуществления полипептид или белок связывается с апикальным доменом TfR.

[0316] В некоторых вариантах осуществления агент (*например*, терапевтический агент) связан со сконструированными TfR-связывающим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления сконструированный TfR-связывающий полипептид содержит СНЗ- или СН2-домены, которые содержат модификации, позволяющие полипептиду специфически связываться с TfR. Неограничивающие примеры подходящих сконструированных TfR-связывающих полипептидов описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент связан со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, который описан в Таблице 4 или Таблице 5. В некоторых вариантах осуществления агент связан со сконструированными TfR-связывающим полипептидом, выбранным из группы, состоящей из СНЗС.35.20.2, СНЗС.35.23.2, СНЗС.35.23.5, СНЗС.35.21.17 и СНЗС.35.21.17.2.

[0317] В некоторых вариантах осуществления агент (*например*, терапевтический агент) связан с TfR-связывающим пептидом. В некоторых вариантах осуществления TfR-связывающий пептид представляет собой короткий пептид, имеющий длину около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. Способы создания, скрининга и идентификации подходящих пептидов (*т. е.*, которые связываются с TfR с аффинностью в пределах необходимого диапазона) известны в данной области техники. Например, для идентификации подходящих пептидов можно использовать стратегию фагового дисплея, в которой проводят чередующиеся циклы отрицательного и положительного отбора. Эта стратегия описана, *например*, в Lee et al., Eur. J. Biochem., 268:2004-2012 (2001), которая в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки.

[0318] В некоторых вариантах осуществления агент (*например*, терапевтический агент) связан с TfR-связывающим антителом. Неограничивающие примеры подходящих

TfR-связывающих антител включают анти-TfR антитела OX26 (*т. е.* имеющие аффинность около 76 нМ, 108 нМ и 174 нМ), которые раскрыты в Thom et al., Mol. Pharm., 15(4):1420-1431 (2018). В некоторых вариантах осуществления агент связан с белком, который содержит вариабельную область антитела, которая специфически связывается с TfR. В некоторых случаях белок содержит Fab или scFv.

[0319] В некоторых вариантах осуществления агент (*например*, терапевтический агент) представляет собой белок (*например*, фермент). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой заместительное белковое терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой белок или фермент, дефицит которого (*например*, недостаточная экспрессия или отсутствие) наблюдается в клетке или ткани (*например*, нервной клетке или ткани) млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой белок или фермент, который является эндогенным или экспрессируется в нормальной здоровой клетке или ткани (*например*, нервной клетке или ткани) млекопитающего, но дефицит которого наблюдается (*например*, в соответствующей клетке или ткани) у млекопитающего, которого лечат от LSD.

[0320] В некоторых вариантах осуществления заместительное белковое терапевтическое средство представляет собой фермент. Любое число агентов (*например*, заместительных белковых терапевтических средств, таких как ферменты) можно связывать с полипептидами или белками (*например*, которые связываются с TfR) для лечения различных LSD. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой фермент, который в большей степени снижает накопление токсических продуктов метаболизма в головном мозге млекопитающего, имеющего LSD, когда он связан с полипептидом или белком, по сравнению со случаем, когда фермент связан с референсным полипептидом или белком. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS), а LSD представляет собой синдром Хантера. В некоторых случаях токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата дисахариды и/или полученные из дерматансульфата дисахариды. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), а LSD представляет собой синдром Санфилиппо. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой кислую сфингомиелиназу (ASM), а LSD представляет собой болезнь Ниманна - Пика. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой β -глюкоцереброзидазу (GBA), а LSD представляет собой болезнь Гоше.

[0321] В некоторых вариантах осуществления агент (*например*, терапевтический агент) содержит вариабельную область антитела. В некоторых вариантах осуществления агент содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления агент содержит Fab или scFv. В некоторых вариантах осуществления агент не содержит вариабельную область антитела. В некоторых случаях агент не содержит Fab антитела против бета-секретазы 1 (BACE1).

Дополнительные варианты осуществления и линкеры

[0322] Полипептид (*например*, полипептид с модифицированным СНЗ- или СН2-доменом, дополнительно описанный в данном документе) может быть соединен с другим доменом Fc-области. В некоторых вариантах осуществления полипептид с модифицированным СНЗ-доменом соединен с СН2-доменом, который может быть СН2-доменом природного происхождения или вариантным СН2-доменом, как правило, с С-концом СН2-домена. В некоторых вариантах осуществления полипептид с модифицированным СН2-доменом соединен с СНЗ-доменом, который может быть СНЗ-доменом природного происхождения или вариантным СНЗ-доменом, как правило, с N-концом СНЗ-домена. В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий модифицированный СН2-домен, соединенный с СНЗ-доменом, или полипептид, содержащий модифицированный СНЗ-домен, соединенный с СН2-доменом, дополнительно содержит частичную или полную шарнирную область антитела, что приводит к получению формата, в котором полипептид с модифицированным СНЗ-доменом или полипептид с модифицированным СН2-доменом является частью Fc-области, имеющей частичную или полную шарнирную область. Шарнирная область может быть получена из любого подкласса или изоформа иммуноглобулина. Иллюстративной шарнирной областью иммуноглобулина является шарнирная область IgG, такая как шарнирная область IgG1, *например*, аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:95).

[0323] В некоторых вариантах осуществления сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело слиты с пептидом или белком, применимым для очистки белка, *например*, полигистидином, эпитопными тэгами, *например*, FLAG, с-Мус, гемагглютининовыми тэгами и т. п., глутатион-S-трансферазой (GST), тиоредоксином, протеином А, протеином G или мальтозосвязывающим белком (MBP). В некоторых случаях пептид или белок, с которым слиты сконструированные TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело, может содержать сайт расщепления протеазами, такой как сайт расщепления для фактора Ха или тромбина.

[0324] В способах по данному изобретению агент (*например*, терапевтический агент) связан с полипептидом или белком (*например*, сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом). Линкер может представлять собой любой линкер, подходящий для соединения агента с полипептидом или белком. В некоторых вариантах осуществления связь подлежит ферментативному расщеплению. В определенных вариантах осуществления связь подлежит расщеплению ферментом, присутствующим в центральной нервной системе.

[0325] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Пептидный линкер может иметь такую конфигурацию, которая обеспечивает возможность вращения агента (*например*, терапевтического агента) и

полипептида или белка относительно друг друга; и/или устойчивость к расщеплению протеазами. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть гибким линкером, *например*, содержащим аминокислоты, такие как Gly, Asn, Ser, Thr, Ala и т. п. Такие линкеры конструируют, используя известные параметры. Например, линкер может содержать повторы, такие как повторы Gly-Ser.

[0326] В различных вариантах осуществления связывание агента (*например*, терапевтического агента) с полипептидом или белком (*например*, сконструированными TfR-связывающим полипептидом, TfR-связывающим пептидом или TfR-связывающим антителом) можно обеспечивать, используя хорошо известные химические перекрестно-сшивающие реагенты и протоколы. Например, существует большое число химических перекрестно-сшивающих агентов, которые известны специалистам в данной области техники и пригодны для перекрестного сшивания полипептида или белка с представляющим интерес агентом. Например, перекрестно-сшивающие агенты представляют собой гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие агенты, которые можно применять для поэтапного связывания молекул. Гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие линкеры дают возможность разрабатывать более специфические способы связывания для конъюгации белков, тем самым снижая появление нежелательных побочных реакций, таких как гомобелковые полимеры.

[0327] Агент (*например*, терапевтический агент) можно связывать с N-концевой или C-концевой областью полипептида или белка, или присоединять к любой области полипептида или белка (*например*, сконструированных TfR-связывающего полипептида, TfR-связывающего пептида или TfR-связывающего антитела) при условии, что агент не препятствует связыванию полипептида или белка с трансферриновым рецептором.

Фармацевтические композиции и наборы

[0328] В других аспектах предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие описанный в данном документе слитый белок.

Фармацевтические композиции

[0329] Руководство по приготовлению составов для применения в данном изобретении можно найти ряде справочников по фармацевтическому приготовлению и составлению, которые известны специалистам в данной области техники.

[0330] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит описанный в данном документе слитый белок и дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые не препятствуют или иным образом не ингибируют активность активного агента.

[0331] В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, интратекального, глазного, интрацеребровентрикулярного, внутримышечного, перорального, внутрибрюшинного, трансдермального, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или

более физиологически приемлемых соединений, которые действуют, например, для стабилизации композиции или для повышения или снижения всасывания полипептида. Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, которые снижают клиренс или гидролиз активных агентов, или наполнители, или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы также доступны в данной области техники.

[0332] Описанные в данном документе фармацевтические композиции можно готовить, *например*, посредством традиционного смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, инкапсуляции, заключения или лиофилизации. Следующие способы и наполнители являются иллюстративными.

[0333] Для перорального введения описанный в данном документе слитый белок можно готовить путем объединения его с фармацевтически приемлемыми носителями, которые хорошо известны в данной области техники. Такие носители позволяют получать слитый белок в форме таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, пастообразных смесей, суспензий и т. п. для перорального приема пациентом, подлежащим лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения можно получать путем смешивания слитого белка с твердым наполнителем, необязательно, измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, при необходимости, для получения основ таблеток или драже. Подходящие наполнители включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы и/или поливинилпирролидон. При необходимости можно добавлять дезинтегрирующие агенты, такие как перекрестно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

[0334] Как описано выше, описанный в данном документе слитый белок можно готовить для парентерального введения путем инъекции, *например*, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Для инъекции слитый белок можно вносить в препараты путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, при необходимости, с традиционными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления слитый белок можно готовить в водных растворах, таких как физиологически совместимые буферы,

неограничивающие примеры которых включают раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Составы для инъекций могут быть представлены в единичной дозированной форме, *например*, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0335] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок готовят для доставки в составе с замедленным высвобождением, контролируемым высвобождением, пролонгированным высвобождением, высвобождением с регулированием по времени или с отсроченным высвобождением, *например*, в полупроницаемых матрицах из твердых гидрофобных полимеров, содержащих активный агент. Были разработаны различные типы материалов с замедленным высвобождением, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Составы с пролонгированным высвобождением включают таблетки с пленочным покрытием, системы из множества частиц или гранул, матричные технологии с использованием гидрофильных или липофильных материалов и таблетки на основе воска с порообразующими наполнителями. Как правило, составы с замедленным высвобождением можно готовить, используя полимеры природного или синтетического происхождения, *например*, полимерные винилпирролидоны, такие как поливинилпирролидон; карбоксивинилгидрофильные полимеры; гидрофобные и/или гидрофильные гидроколлоиды, такие как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и гидроксипропилметилцеллюлоза; и карбоксиполиметилен.

[0336] Как правило, фармацевтическая композиция для применения при введении *in vivo* является стерильной. Стерилизацию можно проводить в соответствии со способами, известными в данной области техники, *например*, путем термической стерилизации, стерилизации паром, стерильной фильтрации или облучения.

[0337] Дозировки и необходимая концентрация лекарственного препарата в описанных в данном документе фармацевтических композициях могут варьироваться в зависимости от предполагаемого конкретного применения. Подходящие дозировки также описаны в разделе XII выше.

Наборы

[0338] В некоторых вариантах осуществления предложен набор для применения при лечении LSD, *например*, синдрома Хантера, синдрома Санфилиппо А, болезни Ниманна - Пика, болезни Гоше или болезни Паркинсона, содержащий описанный в данном документе слитый белок.

[0339] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. *Например*, в некоторых вариантах осуществления набор содержит описанный в данном документе слитый белок и дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов для

применения при лечении неврологических симптомов LSD. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструктивные материалы, содержащие указания (*т. е.* протоколы) для практической реализации способов, описанных в данном документе (*например*, инструкции по применению набора для введения слитого белка, содержащего ERT-фермент, через гематоэнцефалический барьер). Хотя инструктивные материалы, как правило, содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются ими. Любой носитель, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен данным раскрытием. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, электронные носители (*например*, магнитные диски, пленки, картриджи, чипы), оптические носители (*например*, CD-ROM) и т. п. Такие носители могут включать адреса интернет-сайтов, на которых предоставлены такие инструктивные материалы.

Примеры

[0340] Данное раскрытие будет более подробно описано посредством конкретных примеров. Следующие примеры приведены только в иллюстративных целях и никоим образом не подразумевают ограничение данного раскрытия. Специалистам в данной области техники будут понятны различные некритичные параметры, которые можно менять или модифицировать для получения по существу таких же результатов. Были предприняты усилия для того, чтобы обеспечить точность в отношении используемых числовых значений (*например*, количества, температуры и *т. д.*), однако могут присутствовать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, при практической реализации данного раскрытия применяют традиционные способы химии белков, биохимии, технологий рекомбинантных ДНК и фармакологии, которые соответствуют данной области техники. Такие технологии полностью описаны в литературе. Кроме того, для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что способы конструирования, применяемые к определенным библиотекам, также можно применять к другим библиотекам, описанным в данном документе.

Пример 1. Конструирование слитых белков, содержащих идуронат-2-сульфатазу (IDS).

Разработка и клонирование

[0341] Конструировали слитые белки IDS-Fc, которые содержат (i) слитый полипептид, в котором зрелый человеческий фермент IDS слит с фрагментом человеческого IgG1, который содержит Fc-область («слитый полипептид IDS-Fc»), и (ii) модифицированный фрагмент человеческого IgG1, который содержит мутации в Fc-области, которые обеспечивают связывание трансферринового рецептора (TfR) («модифицированный Fc-полипептид»). В частности, создавали слитые полипептиды IDS-Fc, в которых фрагменты IDS были слиты с N- или C-концом Fc-области человеческого IgG1. В некоторых случаях между фрагментами IDS и IgG1 помещали линкер, чтобы ослабить какое-либо стерическое несоответствие между двумя фрагментами. Во всех конструкциях выше места слияния был вставлен сигнальный пептид из каппа-цепи V-III,

аминокислоты 1-20 (UniProtKB ID - P01661), чтобы облегчить секрецию, а IDS был усечен так, чтобы состоять из аминокислот S26-P550 (UniProtKB ID - P22304). Используемый фрагмент Fc-области человеческого IgG1 соответствует аминокислотам D104-K330 последовательности в UniProtKB ID P01857 (позиции 221-447, нумерация EU, которая содержит 10 аминокислот шарнирной области (позиции 221-230)). В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид, полученный из остатков человеческого IgG1 D104-K330, но без слияния с IDS, котрансфицировали со слитым полипептидом IDS-Fc с целью создания гетеродимерных слитых белков с одним ферментом IDS («монозим»). В некоторых конструкциях фрагменты IgG1 содержали дополнительные мутации для облегчения гетеродимеризации двух Fc-областей. Контрольные слитые белки IDS-Fc, в которых отсутствуют мутации, обеспечивающие связывание TfR, разрабатывали и конструировали аналогичным образом с разницей в том, что в этих белках отсутствовали мутации, обеспечивающие связывание TfR. В качестве дополнительного контроля мы создали IDS (аминокислоты S26-P550) с C-концевым гексагистиридиновым тэгом (SEQ ID NO:241) для облегчения обнаружения и очистки.

[0342] TfR-связывающие слитые белки IDS-Fc, используемые в примерах, представляют собой димеры, образуемые слитым полипептидом IDS-Fc и модифицированным Fc-полипептидом, который связывается с TfR. В случае димеров, в которых фермент IDS связан с N-концом Fc-области, слитый полипептид IDS-Fc может иметь последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235. В этих последовательностях IDS-последовательность подчеркнута и содержит цистеин в позиции 59 (двойное подчеркивание), модифицированный до формилглицина. IDS соединяли с Fc-полипептидом линкером GGGGS (SEQ ID NO:239). Часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113) была включена в N-конец Fc-полипептида. Последовательность CH2-домена начинается в позиции 541 SEQ ID NO:115, 231 и 235.

[0343] Слитый белок IDS-Fc ETV:IDS 35.21, используемый в примерах, представляет собой димер, образуемый слитым полипептидом IDS-Fc, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235, и модифицированным Fc-полипептидом, который связывается с TfR, имеющим последовательность SEQ ID NO:116. Первые 10 аминокислот представляют часть шарнирной области IgG1. Последовательность CH2-домена начинается в позиции 11 SEQ ID NO:116.

[0344] Слитый белок IDS-Fc ETV:IDS 35.21.17.2, используемый в примерах, представляет собой димер, образуемый слитым полипептидом IDS-Fc, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235, и модифицированным Fc-полипептидом, который связывается с TfR, имеющим последовательность SEQ ID NO:228. Первые 10 аминокислот представляют часть шарнирной области IgG1. Последовательность CH2-домена начинается в позиции 11 SEQ ID NO:228.

[0345] Слитый белок IDS-Fc ETV:IDS 35.23.2, используемый в примерах, представляет собой димер, образуемый слитым полипептидом IDS-Fc, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235, и модифицированным Fc-

полипептидом, который связывается с TfR, имеющим последовательность SEQ ID NO:229. Первые 10 аминокислот представляют часть шарнирной области IgG1. Последовательность CH2-домена начинается в позиции 11 SEQ ID NO:229.

[0346] Слитый белок IDS-Fc ETV:IDS 35.21.17, используемый в примерах, представляет собой димер, образуемый слитым полипептидом IDS-Fc, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO:115, 231 и 235, и модифицированным Fc-полипептидом, который связывается с TfR, имеющим последовательность SEQ ID NO:151. N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида может содержать часть шарнирной области IgG1 (*например*, SEQ ID NO:113).

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

[0347] Для экспрессии рекомбинантного фермента IDS, слитого с Fc-областью, клетки ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) трансфицировали релевантными ДНК-конструкциями, используя набор для трансфекции CHO ExpiFectamine™ в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Клетки выращивали в среде для экспрессии ExpiCHO™ при 37 °C, 6% CO₂ и 120 об/мин в орбитальном шейкере (Infors HT Multitron). Вкратце, клетки ExpiCHO™ в фазе логарифмического роста трансфицировали при плотности 6×10^6 клеток/мл 0,8 мкг ДНК-плазмиды на мл объема культуры. После трансфекции температуру клеток снова устанавливали на 37 °C и добавляли в трансфицированные культуры указанный фидер через 18-22 ч после трансфекции. Супернатанты культур трансфицированных клеток собирали через 120 ч после трансфекции путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 20 мин. Осветленные супернатанты фильтровали (0,22 мкм мембрана) и хранили при 4 °C. Экспрессию содержащего эпитопный тэг фермента IDS (используемого в качестве контроля) осуществляли, как описано выше, с минимальными модификациями. Вкратце, фермент IDS, имеющий C-концевой гексагистидиновый тэг (SEQ ID NO:241), экспрессировали в клетках ExpiCHO.

[0348] Слитые белки IDS-Fc со сконструированными Fc-областями (или без них), обеспечивающими связывание TfR, очищали из супернатантов клеточных культур, используя аффинную хроматографию с протеином А. Супернатанты загружали в аффинную колонку протеином А HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences с применением системы Akta Pure). Затем колонку промывали > 20 объемами колонки (ОК) ФСБ. Связанные белки элюировали, используя 100 мМ цитратный/NaOH буфер с pH 3,0, содержащий 150 мМ NaCl. Сразу после элюирования фракции нейтрализовали, используя буфер на основе 1 М аргинина и 670 мМ сукцината с pH 5,0 (в разведении 1:5). Гомогенность слитых белков IDS-Fc в элюированных фракциях оценивали с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ.

[0349] Для очистки меченого гексагистидином (SEQ ID NO:241) фермента IDS проводили исчерпывающий диализ трансфицированных супернатантов против 15 л 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,4, содержащего 100 мМ NaCl, в течение ночи. Прошедшие диализ супернатанты связывали с колонкой HisTrap (GE Healthcare Life Sciences с применением

системы Akta Pure). После связывания колонку промывали 20 ОК ФСБ. Связанные белки элюировали, используя ФСБ, содержащий 500 мМ имидазола. Гомогенность фермента IDS в элюированных фракциях оценивали с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ. Объединенные фракции, содержащие фермент IDS, разводили 1:10 в 50 мМ Трис, pH 7,5, и дополнительно очищали, используя высокопроизводительную хроматографию с сефарозой Q (GE Healthcare). После связывания колонку промывали 10 ОК 50 мМ Трис, pH 7,5. Связанные белки элюировали, используя линейный градиент до 50 мМ Трис, pH 7,5, и 0,5 М NaCl, и собирали в 1 ОК фракции. Чистоту фракций оценивали с помощью невосстанавливающего ДСН-ПААГ. Как проиллюстрировано на Фиг. 1, очистка позволяла получать гомогенные слитые белки IDS-Fc и меченный гексагистидином (SEQ ID NO:241) фермент IDS.

Пример 2. Изучение характеристик слитых белков IDS.

Слитые белки IDS-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом связываются с человеческим TfR

[0350] Чтобы определить, влияют ли слитые белки IDS-Fc со сконструированным связыванием TfR на способность модифицированного Fc-домена взаимодействовать с человеческим TfR, оценивали аффинность этого белка в отношении человеческого TfR, используя анализ Biacore™ методом поверхностного плазмонного резонанса. Сенсорные чипы CM5 серии S от Biacore™ иммобилизовали с антителом против Fab человека (набор для захвата Fab человека от GE Healthcare). Проводили захват 5 мкг/мл слитых белков IDS-Fc в течение 1 минуты в каждой проточной ячейке и вводили серийные 3-кратные разведения апикального домена TfR человека при скорости потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали при 3-минутной ассоциации и 3-минутной диссоциации. После каждого ввода чип восстанавливали, используя 10 мМ глицин-HCl (pH 2,1). Ответ связывания корректировали путем вычитания ЕО от проточной ячейки с захваченным нерелевантным IgG при такой же плотности. Значения аффинности в стационарном состоянии получали, строя зависимость ответа при равновесии от концентрации, используя программное обеспечение Biacore™ T200 Evaluation Software v3.1. Как проиллюстрировано на Фиг. 2, анализ Biacore™ позволил установить, что слитые белки IDS-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом в Fc-области связываются с человеческим TfR. Также анализ Biacore™ позволил установить, что слитый белок IDS-Fc ETV:IDS 35.21 связывается с человеческим TfR с аффинностью ~ 200 нМ.

Слитые белки IDS-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом являются активными in vitro, в клетках и in vivo

[0351] Оценивали in vitro и клеточную активность сконструированных TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc, чтобы продемонстрировать, что IDS сохраняет свою ферментативную активность при слиянии с фрагментом IgG человека. In vitro активность измеряли с помощью двухэтапного флуориметрического ферментного анализа, используя искусственный субстрат. В частности, 20 мкл субстрата 1 мМ динатриевой соли 4-метилумбеллиферил α -L-идопиранозидурановой кислоты-2-сульфата (Carbosynth Limited,

#EM03201) разводили в аналитическом буфере (100 мМ ацетат натрия, 10 мМ ацетат свинца, 0,05% Тритон X-100, pH 5,0) и смешивали с 10 мкл 0,2 нМ IDS. Первую реакцию инкубировали в течение 4 ч при 37°C и останавливали с помощью 60 мкл 0,2 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5,0. Вторую реакцию проводили в присутствии 15 мкг клеточного лизата из клеток НЕК 293Т, временно трансфицированных человеческой α -идуронидазой (IDUA), инкубировали в течение 16 ч при 37°C и останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М натрий-карбонатного буфера, pH 10,5. Затем измеряли флуоресценцию реакционного раствора (возбуждение на 365 нм и испускание на 450 нм). Стандартную кривую 4-метилумбеллиферона аппроксимировали линейной регрессией, чтобы рассчитать количество продукта, и подтверждали как менее 10% общего расщепления субстрата. Специфическую активность (нмоль продукта/мин/нмоль IDS) рассчитывали путем деления количества продукта на время реакции и молярное количество IDS.

[0352] Анализ ферментативной активности *in vitro* продемонстрировал, что слитые белки IDS-Fc были активными, и показал, что слияние Fc-области с IDS не препятствует ферментативной активности (Фиг. 3).

[0353] Клетки с нокаутом (НО) IDS создавали, используя CRISPR/CAS9, чтобы получить клеточную систему для исследования клеточной активности сконструированных слитых белков IDS-Fc. Клетки НЕК 293Т (ATCC) трансфицировали вектором CRISPR/CAS9 pCas-Guide-EF1a-GFP (Origene), содержащим направляющие последовательности, нацеленные на вторую половину экзона 1 в человеческом IDS. Одноклеточные клоны анализировали в отношении наличия инделов в геномной последовательности IDS, следуя инструкциям производителя набора для обнаружения мутаций Guide-it (Clontech). Для идентификации клеток IDS НО анализировали лизаты индел-положительных клеточных клонов, используя описанный выше анализ фермента IDS *in vitro*. Вкратце, анализ активности *in vitro* проводили, используя 12,5, 25, 50 и 100 мкг клеточного лизата в аналитическом буфере на основе ацетата свинца, pH 5,0 (100 мМ ацетат натрия, 10 мМ ацетат свинца, 0,02% азид Na), как было описано ранее (Voznyi et al., J. Inherit. Metab. Dis., 24:675-80 (2001)). Реакцию начинали, объединяя 10 мкл нормализованного клеточного лизата (в воде) с 1 мМ субстратом в 20 мкл буфера на основе ацетата свинца. Первую реакцию инкубировали в течение 4 ч при 37°C и останавливали с помощью 60 мкл 0,2 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5,0. Затем проводили вторую реакцию с добавлением 10 мкг/10 мкл клеточного лизата из клеток НЕК 293Т, временно трансфицированных человеческой α -идуронидазой (IDUA), оставляли на 24 ч при 37°C и останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М натрий-карбонатного буфера, pH 10,3. Затем измеряли флуоресценцию реакционного раствора (возбуждение на 365 нм и испускание на 450 нм). Активность IDS в CRISPR-клонах НЕК 293Т сравнивали с рекомбинантным IDS, используемым в качестве аналитического стандарта, лизатами НЕК дикого типа (ДТ) и лизатами клеток НЕК со сверхэкспрессией IDS. Для клонов с уровнями ферментативной активности, сравнимыми с фоновым сигналом, проводили верификацию последовательности после клонирования мини-Торо

(ThermoFisher) и подтверждали их как НО клоны. В последующем клеточном анализе использовали три уникальных и верифицированных клон IDS НО и три независимые партии клеток НЕК 293Т ДТ.

[0354] Для исследования клеточной активности чистого фермента IDS или слитых белков IDS-Fc разработали гликомический анализ на основе ЖХ-МС/МС, который позволяет отслеживать количество накопления субстрата (гепарансульфата и дерматансульфата) как показатель активности IDS. Накопление субстрата измеряли в клетках IDS НО до и после добавления IDS или слитых белков IDS-Fc в клеточную культуральную среду. Вкратце, клетки три раза промывали ФСБ, осаждали и замораживали. Клеточный осадок обрабатывали ультразвуком в буфере для расщепления дисахаридов (111 мМ NH₄OAc, 11 мМ CaOAc, pH 7,0). Концентрацию белка измеряли, используя анализ BCA (Pierce). Общий белок (100 мкг) добавляли в 100 мкл расщепляющего буфера с 2 мМ ДТТ, 1,25 мМЕ гепариназы I (Galen), 1,25 мМЕ гепариназы II (Galen), 1,25 мМЕ гепариназы III (Galen) и 6,25 мМЕ хондроитиназы В (Galen). Расщепление гепарансульфата и дерматансульфата завершали после трех часов при 30 °С, после чего в каждый образец добавляли по 20 нг внутреннего стандарта (4UA-2S-GlcNCOEt-6S HD009 [Galen]). Ферменты дезактивировали добавлением 6 мкл 250 мМ ЭДТК и кипятили образцы при 95°С в течение 10 минут. Затем образцы центрифугировали при 16000 x G в течение 5 минут при комнатной температуре. Супернатант переносили на 30 кДа центрифужный фильтр Amicon Ultra (Millipore) центрифугировали при 14000 x G в течение 15 минут. Дисахариды концентрировали в непрерывном потоке и ресуспендировали в смеси [1:1, об./об.] аналитический буфер:ацетонитрил, которую затем переносили в пробирки для масс-спектрометрии для дополнительного анализа.

[0355] Анализ дисахаридов, полученных путем ферментативного расщепления гепаран- и дерматансульфата, проводили методом жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA), сопряженной с масс-спектрометрией (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Framingham, MA, USA). В случае каждого анализа 10 мкл образца вводили в колонку ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7 мкм, 2,1×150 мм (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) со скоростью потока 0,4 мл/мин и с температурой колонки 50 °С. Подвижная фаза А состояла из воды с 10 мМ формиатом аммония и 0,1% муравьиной кислотой. Подвижная фаза В состояла из ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Градиент был составлен следующим образом: 0,0-1,0 мин при 85% В, 1,0-5,0 мин от 85% В до 50% В, 5,0-6,0 мин от 50% В до 85% В, 6-8,0 мин выдержка при 85% В. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме отрицательных ионов, применяя следующие настройки: газовая завеса на 30; газ для соударений был установлен на середине; напряжение распыления ионов на -4500; температура на 450; газ-источник ионов 1 на 50; газ-источник ионов 2 на 60. Получение данных проводили, используя Analyst 1.6.3 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) с временем выдержки 25 (мс). Энергия соударений на -30; потенциал

разделения на -80; входной потенциал на -10; ускоряющий потенциал на -10. Обнаружение GAG проводили как [M-H]⁻, используя следующие переходы MMP: D0A0 при m/z 378,1 > 87,0; D0a0 при m/z 378,1 > 175,0; D0S0 при m/z 416,1 > 138,0; D0a4 при m/z 458,1 > 300,0; D0A6, D2A0, D0a6, D2a0 при m/z 458,1 > 97,0; D0S6, D2S0 при m/z 496,0 > 416,1; D2a4, D2a6, D0a10, D2A6 при m/z 538,0 > 458,0; D0S6 при m/z 575,95 > 97,0 4UA-2S-GlcNCOEt-6S при m/z 472,0 (ионный осколок) > 97,0 использовали в качестве внутреннего стандарта (В.С.). GAG идентифицировали на основании времени удержания и совпадения переходов MMP с коммерчески доступными референсными стандартами (Iduron Ltd, Manchester, UK). Количественную оценку проводили, используя MultiQuant 3.0.2 (Sciex), по отношению площадей с В.С. GAG нормализовали к количеству общего белка. Концентрацию белка измеряли, используя анализ BCA (Pierce).

[0356] Значительное накопление субстрата, отражаемое количеством дисахаридов, наблюдаемых после расщепления гепарансульфата и дерматансульфата, наблюдали в клетках IDS НО по сравнению с контрольными линиями клеток, эффект, которого можно было избежать путем добавления рекомбинантного IDS в клетки (Фиг. 4). Это подтвердило, что анализ на основе ЖХ-МС/МС можно использовать для оценки клеточной активности IDS и слитых белков IDS-Fc.

[0357] С помощью этого анализа установили, что обработка клеток слитыми белками IDS-Fc в виде N-концевого монозима (*m. e.* ETV:IDS 35.21.17) или C-концевого монозима, содержащего один и тот же TfR-связывающий Fc полипептид (*m. e.* CN3C.35.21.17), снижала уровни полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов обратно до наблюдаемых в клетках дикого типа (Фиг. 5A). Кроме того, активность N-концевого монозима была сравнима с IDS (Фиг. 5B). Вместе эти данные демонстрируют, что слитые белки IDS-Fc сохраняют ферментативную активность и могут снижать накопление субстрата в клетках IDS НО.

[0358] Клеточную активность слитых белков IDS-Fc также исследовали в фибробластах от пациентов с МПС II и здоровых контрольных субъектов, используя пульс-чейз анализ ³⁵S, в котором ³⁵S интегрирован в новые синтезированные GAG, как было описано ранее (Lu et al., Bioconjugate Chemistry, 21:151-156 (2010)). В фибробластах пациентов с МПС II отсутствует обнаруживаемая активность IDS, что приводит к приблизительно 10-кратному накоплению субстрата и 2,5-кратному накоплению сигнала ³⁵S (Фиг. 5C). Аналогично клеткам IDS НО, слитые белки IDS-Fc, такие как ETV:IDS 35.23.2, показывали высокую эффективность в клетках от пациентов с МПС II, демонстрируя низкую пикомолярную клеточную EC₅₀ в отношении снижения накопления S³⁵-меченных белков (Фиг. 5C). Кроме того, было продемонстрировано, что клеточная активность слитых белков IDS-Fc, таких как ETV:IDS 35.23.2, была М6PR-зависимой, поскольку избыток М6Р ингибировал клиренс ³⁵S-меченных белков в обработанных фибробластах пациентов с МПС II (Фиг. 5D). Вместе эти данные демонстрируют, что М6PR-зависимая миграция и клеточная активность IDS могут сохраняться в формате слитых белков IDS-Fc.

[0359] Для измерения полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов *in vivo*, гликомический анализ ЖХ-МС/МС адаптировали для анализа тканей и жидкостей. Вкратце, все ткани и жидкости собирали и незамедлительно замораживали и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы подвергали 5 циклам замораживания-размораживания и обрабатывали, как описано выше для клеточного анализа. Значительное накопление полученных из гепарансульфата и дерматансульфата дисахаридов наблюдали во всех проанализированных тканях и жидкостях самцов мышей IDS HO по сравнению с одноплетными контрольными самцами дикого типа (Таблица 1). Этот анализ используют для исследования эффективности слитых белков *in vivo*. Мышей IDS HO получали от The Jackson Laboratories (JAX-штамм 024744).

Таблица 1. Гликомический анализ тканей и жидкостей от мышей IDS HO.

Тип образца	Кратность изменения (относительно ДТ)	Общее количество ГС- и ДС- полученных дисахаридов (нг/100 мкг белка)	
		ДТ	IDS HO
Печень	86,3	6,3 (+/- 0,4)	543,6 (+/- 14,7)
Почки	14,1	29,3 (+/- 0,9)	413,4 (+/- 6,1)
Легкие	9,0	40,3 (+/- 6,9)	362,6 (+/- 37,0)
Головной мозг	8,8	5,8 (+/- 0,5)	51,3 (+/- 2,5)
Селезенка	7,4	19,5 (+/- 5,8)	145,2 (+/- 5,3)
Плазма	49,1	0,4 (+/- 0,03)	20,0 (+/- 5,1)
Сыворотка	43,1	0,5 (+/- 0,03)	23,5 (+/- 4,8)
ЦСЖ	20,1	0,04 (+/- 0,007)	0,78 (+/- 0,05)
Моча	13,8	38,83* (+/- 1,4)	537,3* (+/- 92,9)

[0360] Используя этот способ, оценивали уровни полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов в сыворотке мышей дикого типа (ДТ), обработанных базовым раствором, и мышей IDS HO, обработанных IDS или слитым белком IDS-Fc (*m. e.* ETV:IDS 35.21). Исходные измерения до обработки демонстрировали значительное накопление полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов в сыворотке мышей IDS HO по сравнению с мышами ДТ. После обработки слитым белком IDS-Fc уровни полученных из гепаран- и дерматансульфата дисахаридов были существенно снижены в сыворотке мышей IDS HO, показывая сравнимое снижение с наблюдаемым в сыворотке мышей IDS HO, обработанных IDS (Фиг. 6). Эти данные демонстрируют, что слитый белок IDS-Fc является активным *in vivo* и может снижать накопление субстрата у мышей IDS HO. На основании этих данных оценивали распределение и фармакодинамический (ФД) ответ в тканях мышей IDS HO через семь суток после введения одной дозы слитого белка IDS-Fc. Мышам IDS HO внутривенно вводили 40 мг/кг слитого белка IDS-Fc или 5,3 мг/кг IDS (доза, соответствующая 25% молярному эквиваленту) в качестве

положительного контроля и оценивали уровни GAG. Распределение обеих молекул в периферических тканях подтверждали через два часа после введения дозы. Значительное снижение количества субстрата наблюдали в печени, селезенке и легких мышей IDS HO через семь суток после введения дозы слитого белка IDS-Fc (Фиг. 7).

[0361] Чтобы определить, демонстрируют ли TfR-связывающие слитые белки IDS-Fc улучшенную доставку в головной мозг по сравнению с контрольным слитым белком IDS-Fc, мышам с нокином человеческого TfR (TfR^{M/c} НИ) вводили дозу 50 мг/кг TfR-связывающего слитого белка IDS-Fc ETV:IDS 35.21 или контрольного слитого белка IDS-Fc с отсутствием мутаций, которые обеспечивают связывание TfR («IDS:Fc»), и измеряли концентрацию слитого белка IDS-Fc в головном мозге, используя «сэндвич»-анализ ИФА, описанный в примере 3 ниже, через 4 часа после введения дозы. Мышей TfR^{M/c} НИ создавали, как описано в публикации международного патента № WO 2018/152285, используя технологию CRISPR/Cas9 для экспрессии апикального домена человеческого Tfrc в мышинном гене Tfrc; полученный в результате химерный TfR экспрессировался *in vivo* под управлением эндогенного промотора. Существенно большие уровни слитого белка IDS-Fc ETV:IDS 35.21 были обнаружены в головном мозге по сравнению с контрольным слитым белком IDS-Fc со средней концентрацией в головном мозге 23,7 нМ для ETV:IDS 35.21 (Фиг. 8). Поглощение в головном мозге двух дополнительных TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc, ETV:IDS 35.21.17.2 и ETV:IDS 35.23.2, оценивали, используя мышей TfR^{M/c} НИ. Мышам TfR^{M/c} НИ вводили дозу 50 мг/кг ETV:IDS 35.21.17.2, ETV:IDS 35.23.2 или контрольного слитого белка IDS-Fc («IDS:Fc»), и измеряли концентрацию слитого белка IDS-Fc в головном мозге, используя «сэндвич»-анализ ИФА через 2 часа и 8 часов после введения дозы. Введение TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc приводило в 5-кратному повышению поглощения в головном мозге относительно контрольного слитого белка IDS-Fc через 2 часа и 10-20-кратному повышению концентрации в головном мозге через 8 часов после введения дозы (Фиг. 9А). Сывороточная ФК и накопление интактного слитого белка в печени были эквивалентными для обоих ETV:IDS 35.21 и IDS:Fc (Фиг. 9В), что указывает на то, что фрагмент IDS в большой мере определяет фазу распределения плазменного клиренса. Уровни TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc в головном мозге оставались повышенными в течение восьми часов, снижаясь немного с периферическим клиренсом. Вместе эти данные демонстрируют, что взаимодействие TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc с TfR в общем случае сохраняет периферическое распределение и при этом существенно улучшает действие на головной мозг.

Внутривенное введение ETV:IDS снижает количество GAG в головном мозге

[0362] Чтобы исследовать, приводит ли улучшенное действие на головной мозг, наблюдаемое с TfR-связывающими слитыми белками IDS-Fc, описанными выше и приготовленными в соответствии с примером 1 (называемыми в данном документе ETV:IDS), к соответствующему снижению количества накопленного субстрата в головном мозге, создавали мышиную модель с дефицитом IDS, которая несет нокин апикального

домена человеческого TfR в мышинном TfR (называемую в данном документе мышами IDS HO x TfR^{M/c} НИ). Вкратце, самцов мышей TfR^{M/c} НИ скрещивали с самками IDS-гетерозиготных мышей для создания мышей IDS HO в гомозиготном TfR^{M/c} НИ окружении. Все мыши, используемые в этом исследовании, были самцами и содержались при 12-часовом цикле день-ночь с доступом к пище (рацион LabDiet JL irradiated 6F) и воде ad libitum.

[0363] Мышам IDS HO x TfR^{M/c} НИ внутривенно вводили одну или четыре еженедельных эквивалентных по активности дозы ETV:IDS или IDS (747 мкмоль продукта/мин/кг или 40 мг/кг и 14,2 мг/кг соответственно) и оценивали фармакокинетические и фармакодинамические ответы. В частности, эффект периферического введения ETV:IDS на GAG в головном мозге и тканях у мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ определяли, используя 2-месячных мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ, которым внутривенно (в/в) вводили солевой раствор, IDS (14,2 мг/кг массы тела) или ETV:IDS (40 мг/кг массы тела) один раз (n=8) или один раз в неделю в течение 4 недель (n=8). Однопометных 2-месячных мышей TfR^{M/c} НИ, которым вводили в/в солевой раствор один раз (n=5) или один раз в неделю в течение 4 недель (n=5) использовали в качестве контроля. В случае животных, которым вводили IDS или ETV:IDS, прижизненные образцы сыворотки получали путем подчелюстного взятия крови в разные моменты времени. Всех животных умерщвляли через 7 суток после введения одной дозы или через 7 суток после введения последней 4-недельной дозы. Мочу, сыворотку, ЦСЖ, печень, почки, селезенку, легкие, сердце и правое полушарие мозга рассекали и быстро замораживали на сухом льду.

[0364] После одной дозы ETV:IDS демонстрировал сходный профиль сывороточного клиренса с IDS согласно данным анализа на основе ИФА, описанного в примере 3 ниже, для обнаружения концентрации IDS, предоставляя дополнительное подтверждение того, что фермент в большой степени определяет периферический клиренс (Фиг. 10A). Уровни ETV:IDS в головном мозге были существенно повышены по сравнению с IDS через два часа после введения дозы со средней концентрацией 8,4 и 1,6 нМ соответственно, а уровни ETV:IDS в печени и селезенке были существенно повышены по сравнению с IDS (Фиг. 10B).

[0365] Чтобы определить, снижает ли ETV:IDS уровни субстрата в головном мозге, оценивали уровни GAG, как описано в примере 2, у мышей IDS HO x TfR^{M/c} НИ после одной дозы или четырех еженедельных доз фермента. IDS немного снижал уровни GAG в головном мозге в ранние моменты времени, но был неэффективен в отношении существенного снижения GAG через четыре недели обработки (Фиг. 10C). Однако ETV:IDS снижал уровни GAG в головном мозге приблизительно на 58% после одной дозы и на 71% после четырех недель обработки (Фиг. 10C). Это приводило к сопутствующему снижению GAG ЦСЖ приблизительно на 75% после одной дозы, которое сохранялось после четырех недель введения доз (Фиг. 10C). Обе молекулы эффективно снижали уровни GAG в печени и селезенке через одну неделю, и ответ сохранялся при повторном

введении (Фиг. 10С), демонстрируя, что связывание TfR не оказывает негативного влияния на фармакодинамические ответы в этих тканях. Вместе эти данные демонстрируют, что ETV:IDS существенно повышает действие фермента на головной мозг и значительно снижает накопление субстрата как в периферических тканях, так и в ЦНС.

Пример 3. Фармакокинетические характеристики слитых белков IDS.

[0366] В этом примере описано изучение фармакокинетических (ФК) характеристик сконструированных слитых белков IDS-Fc в плазме мышей.

[0367] Чтобы определить плазменные время полужизни и клиренс TfR-связывающих слитых белков IDS-Fc, 7-8-месячным самцам мышей C57BL/6 вводили дозу 10 мг/кг двух молекул слитых белков IDS-Fc (N-концевого монозима и C-концевого монозима) посредством инъекции в хвостовую вену. Концентрацию слитых белков IDS-Fc, оставшихся в плазме через 24 часа, измеряли, используя анализ на основе ИФА. Вкратце, концентрацию слитых белков IDS-Fc в плазме мышей количественно оценивали, используя «сэндвич»-ИФА. Анти-Fc захватывающее антитело (Abcam #ab124055) наносили на 384-луночный планшет MaxiSorp™ (Thermo Scientific #464718) при 3 мкг/мл. Планшет блокировали 5% БСА, а затем инкубировали с плазмой, разведенной 1:1000 или 1:10000. После этого добавляли поликлональное анти-IDS антитело для обнаружения (R&D Systems #AF2449) в концентрации 0,5 мкг/мл, а после него - вторичное антикозье конъюгированное с HRP антитело. Затем в планшетах проводили реакцию, используя субстрат ТМБ, останавливали серной кислотой и измеряли поглощение на 450 нм на планшет-ридере BioTek. Стандартные кривые представляли индивидуальные конструкции от 200-0,1 нг/мл в 4-кратном серийном разведении и были аппроксимированы, используя четырехпараметрическую логистическую регрессию.

[0368] С помощью этого анализа установили, что терминальное плазменное время полужизни слитых белков IDS-Fc составляло 7,7-10 ч (Таблица 2). Со слитыми белками IDS-Fc не наблюдали никаких непредусмотренных тенденций в ФК *in vivo*.

Таблица 2. Фармакокинетика слитых белков IDS-Fc у мышей в течение 24 часов.

Описание ETV:IDS	Доза (мг/кг)	CL (мл/ч/кг)	CL (мл/сут/кг)	Терминальное t _{1/2} (ч)
N-концевой монозим	10	22,0	528	10
C-концевой монозим	10	42,6	1020	7,7

Пример 4. Конструирование слитых белков, содержащих кислую сфингомиелиназу (ASM).

Разработка и клонирование

[0369] Слитые белки ASM-Fc конструировали в виде димеров слитого полипептида, в котором зрелый человеческий фермент ASM слит с фрагментом человеческого IgG1, который содержит Fc-область («слитый полипептид ASM-Fc»). В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид ASM-Fc содержит

модифицированную Fc-область, содержащую мутации, которые обеспечивают связывание трансферринового рецептора (TfR). В частности, создавали слитые полипептиды ASM-Fc, в которых фрагменты ASM были слиты с N-концом Fc-области человеческого IgG1. В некоторых случаях между фрагментами ASM и IgG1 помещали линкер, чтобы ослабить какое-либо стерическое несоответствие между двумя фрагментами. Во всех конструкциях была удалена нативная сигнальная последовательность ASM, аминокислоты 1-46 (UniProtKB ID - P17405) и замещена сигналом секреции из каппа-цепи V-III, аминокислоты 1-20 (UniProtKB ID - P01661), для улучшения секреции ASM. Кроме того, в слитых белках ASM был усечен в C-конце, заканчиваясь аминокислотой Q620, для предотвращения какого-либо нежелательного расщепления между ASM и Fc-областью человеческого IgG1. Затем фрагмент Fc-области человеческого IgG1 (UniProtKB ID - P01857) помещали в рамку с C-концом ASM, начиная с аминокислоты E99, с заменой цистеина в позиции 103 серином. В некоторых вариантах осуществления фрагменты IgG1 содержали дополнительные мутации для облегчения гетеродимеризации двух Fc-областей. Кроме того, создавали слитые белки ASM-Fc, содержащие одну или две молекулы ASM. В качестве контроля конструировали слитые белки ASM-гексагистидин (SEQ ID NO:241), состоящие из аминокислот KMC 1-628, усеченные для удаления C-концевого цистеина и стимуляции ферментной активации, и сливали в C-конце с гексагистидиновым тэгом (SEQ ID NO:241).

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

[0370] Для экспрессии рекомбинантного фермента ASM, слитого с Fc-областью, клетки ExpiCHO-S (Thermo Fisher) трансфицировали при плотности 6×10^6 клеток/мл комплексом ExpiFectamine CHO/плазмидная ДНК в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). После трансфекции клетки инкубировали при 32°C в увлажненной атмосфере 6-8% CO₂ в орбитальном шейкере (Infors HT Multitron). Через сутки после трансфекции в культуру добавляли усилитель ExpiFectamine и фидер ExpiFectamine. Супернатант среды собирали путем центрифугирования через 48-72 часа экспрессии. Осветленный супернатант дополняли не содержащим ЭДТК ингибитором протеаз (Roche) и хранили при -80 °C.

[0371] Для очистки слитого белка ASM-Fc супернатант осветленной среды дополняли 200 мкМ ацетатом цинка (Sigma Aldrich). Супернатант загружали в аффинную колонку HiTrap MabSelect SuRe с протеином А (GE Healthcare Life Sciences) и промывали 200 мМ аргинином и 137 мМ сукцинатным буфером, pH 5,0 (аргинин-сукцинатный буфер). Слитые белки элюировали в 100 мМ цитратном буфере QB, pH 3,0, дополненном 200 мкМ ацетатом цинка. Сразу после элюирования добавляли аргинин-сукцинатный буфер для доведения pH. Белковые агрегаты отделяли от слитых белков ASM-Fc методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). Подвижную фазу ЭХ держали в аргинин-сукцинатном буфере, pH 5,0, дополненном 200 мкМ ацетатом цинка. Все этапы хроматографии проводили, используя систему Akta Pure или систему Akta Avant (GE Healthcare Life Sciences).

Чистоту фракций оценивали с помощью невосстанавливающего ДСН-ПААГ. Как проиллюстрировано на Фиг. 11, очистка позволяла получать гомогенные слитые белки ASM-Fc.

Пример 5. Изучение характеристик слитых белков ASM.

Слитые белки ASM-Fc активны in vitro и в клетках

[0372] Чтобы продемонстрировать, что ASM сохраняет свою ферментативную активность при слиянии с тяжелой цепью человеческого IgG, оценивали *in vitro* и клеточную активность слитых белков ASM-Fc. *In vitro* активность рекомбинантного фермента ASM или рекомбинантных слитых белков ASM-Fc измеряли, используя синтетический хромогенный аналог сфингомиелина. В частности, 2,5 мМ 2-(N-гексадеканоиламино)-4-нитрофенилфосфорилхолин (EMD Millipore) смешивали с 0,75 нМ ASM в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,3; конечная концентрация в 100 мкл реакционного объема). Реакцию инкубировали в течение 16 ч при 37°C и останавливали добавлением эквивалентного объема 0,2 М NaOH. Затем измеряли поглощение реакционного раствора на 410 нм. Стандартную кривую п-нитрофенола аппроксимировали линейной регрессией, чтобы рассчитать количество продукта, и подтверждали как менее 10% общего расщепления субстрата. Специфическую активность (нмоль продукта/мин/нмоль ASM) рассчитывали путем деления количества продукта на время реакции и молярное количество ASM. Анализ ферментативной активности *in vitro* продемонстрировал, что слитые белки ASM-Fc являются активными, и показал, что слияние Fc-области с ASM не препятствует ферментативной активности (Фиг. 12).

[0373] Клетки с нокаутом (НО) ASM создавали, используя CRISPR/CAS9, чтобы получить клеточную систему для исследования клеточной активности слитых белков ASM-Fc. Клетки HEK 293T (ATCC) трансфицировали вектором CRISPR/CAS9 pCas-Guide-EF1a-GFP (Origene), содержащим направляющие последовательности, нацеленные на вторую половину экзона 2 в человеческом SMPD1. Одноклеточные клоны анализировали в отношении наличия инделов в геномной последовательности ASM, следуя инструкциям производителя набора для обнаружения мутаций Guide-it (Clontech). Для клеточных лизатов положительных в отношении инделов клонов проводили анализ фермента ASM *in vitro*, используя хромогенный субстрат ASM 2-N-гексадеканоиламино-4-нитрофенилфосфорилхолин (EMD Millipore). Вкратце, анализ активности *in vitro* проводили, используя 12,5, 25, 50 и 100 мкг клеточного лизата в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,3). Реакцию начинали добавлением 2,5 мМ субстрата и заканчивали через 20 часов добавлением 0,2 М NaOH. Активность ASM в CRISPR-клонах HEK293T сравнивали с рекомбинантным ASM, используемым в качестве аналитического стандарта, лизатами HEK дикого типа (ДТ) и лизатами клеток HEK со сверхэкспрессией ASM. Для клонов с уровнями ферментативной активности, сравнимыми с фоновым сигналом, проводили верификацию последовательности после клонирования мини-Торо (Thermo Fisher Scientific) и подтверждали их как НО клоны. В последующем клеточном анализе использовали три уникальных и верифицированных клона ASM НО и три

независимые партии клеток НЕК293Т ДТ.

[0374] Для исследования клеточной активности чистого фермента ASM или слитых белков ASM-Fc, разработали два клеточных анализа, которые позволяют отслеживать количество накопления субстрата (сфингомиелина) в клетках ASM НО на базовом уровне и после обработки ASM или слияниями ASM-Fc. Сначала разработали анализ на основе визуализации для отслеживания накопления BODIPY-конъюгированного C5-сфингомиелина в клетках ASM НО. Вкратце, клетки НЕК293Т ДТ и ASM НО высевали в DMEM, дополненную 10% ФБС (Gibco), при низкой плотности в PDL-покрытые 96-луночные планшеты (Perkin Elmer). Через четыре часа после высевания в каждую лунку добавляли рекомбинантный фермент ASM, слитые белки ASM-Fc или контрольный буфер и инкубировали в течение 48 часов при 37 °С. Среду удаляли, замещали свежей средой, содержащей 1 мкМ BODIPY-C5-сфингомиелин (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали при 37°С в течение 16 часов. Затем клетки промывали ФСБ, фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали ядерным (ДАФИ, Thermo Fisher) и цитоплазматическим (far red cell mask, Thermo Fisher Scientific) красителями. Изображения получали на конфокальном микроскопе Opera Phenix (Perkin Elmer) с объективом 63X с несколькими полями на лунку и тремя лунками на условие. Анализ изображений проводили, используя программное обеспечение Harmony (Perkin Elmer), которое позволяет регистрировать и анализировать среднюю общую интенсивность, число точек и интенсивность точек BODIPY-C5-сфингомиелина в расчете на клетку. Эти рассчитанные на клетку значения усредняли до значения на лунку, которое использовали для анализа эффекта генотипа и/или обработки на накопление BODIPY-C5-сфингомиелина. Значительное накопление BODIPY-C5-сфингомиелина наблюдали в клетках ASM НО по сравнению с контрольными линиями клеток, эффект, которого можно было избежать путем добавления рекомбинантного фермента ASM и слитых белков ASM-Fc (Фиг. 13).

[0375] Чтобы дополнительно проверить, что слитые белки ASM-Fc сохраняют свою активность в клетках, разработали анализ на основе ЖХ-МС/МС, чтобы отслеживать накопление эндогенного сфингомиелина в клетках ASM НО. Клетки НЕК293Т ДТ и ASM НО культивировали и обрабатывали ферментом, как описано выше. Через 68 часов после высевания, с или без обработки ASM или слитым белком ASM-Fc, клетки тщательно промывали ФСБ, а липиды экстрагировали смесью вода:метанол [1:1, об/об] с добавлением соответствующих внутренних стандартов. Липиды экстрагировали, используя метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), перемешивали на вортексе и центрифугировали при 10000×g и 4°С в течение 10 мин. Затем верхнюю фракцию МТБЭ, содержащую липиды, выпаривали до сухости в слабом потоке азота. Липиды ресуспендировали в смеси изопропанол:ацетонитрил:вода [2:1:1, об./об./об.] и затем переносили в пробирки для масс-спектрометрии для дополнительного анализа.

[0376] Анализ липидов проводили методом жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA), сопряженной с

масс-спектрометрией (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Framingham, MA, USA). В случае каждого анализа 5 мкл образца вводили в колонку ВЕН С18 1,7 мкм, 2,1×100 мм (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) со скоростью потока 0,25 мл/мин при 55 °С. Подвижная фаза А состояла из 60:40 смеси ацетонитрил:вода (об./об.) с 10 мМ формиатом аммония+0,1% муравьиная кислота. Подвижная фаза В состояла из 90:10 смеси изопропанол:ацетонитрил (об./об.) с 10 мМ формиатом аммония+0,1% муравьиная кислота. Градиент был составлен следующим образом: 0,0-8,0 мин от 45% В до 99% В, 8,0-10,0 мин при 99% В, 10,0-10,1 мин до 45% В и 10,1-12,0 мин при 45% В. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме положительных ионов, применяя следующие настройки: газовая завеса на 20; газ для соударений был установлен на середине; напряжение распыления ионов на 5200; температура на 250; газ-источник ионов 1 на 50; газ-источник ионов 2 на 60. Получение данных проводили, используя Analyst 1.6 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). Энергия соударений на 40; потенциал разделения на 80; входной потенциал на 10; ускоряющий потенциал на 12,5. Обнаружение церамидов (Cer) проводили как $[M-H_2O+H]^+$, используя следующие переходы ММР: Cer d18:1/16:0 при m/z 538,5 > 264,3; Cer d18:1/18:0 при m/z 566,6 > 264,3; Cer d18:1/20:0 при m/z 594,6 > 264,3; Cer d18:1/22:0 при m/z 622,6 > 264,3; Cer d18:1/24:0 при m/z 650,6 > 264,3; Cer d18:1/24:1 при m/z 648,6 > 264,3; Cer d18:1/17:0 при m/z 552,4 > 264,3 использовали в качестве внутреннего стандарта. Обнаружение сфингомиелинов (SM) проводили как $[M+H]^+$, используя следующие переходы ММР: SM d18:1/16:0 при m/z 703,7 > 184,1; SM d18:1/18:0 при m/z 731,7 > 184,1; SM d18:1/20:0 при m/z 759,7 > 184,1; SM d18:1/22:0 при m/z 787,7 > 184,1; SM d18:1/24:0 при m/z 815,7 > 184,1; SM d18:1/24:1 при m/z 813,7 > 184,1; SM d18:1/18:1 (d9) при m/z 738,7 > 184,1 использовали в качестве внутреннего стандарта. Липиды идентифицировали на основании их времени удержания и свойств ММР коммерчески доступных внутренних стандартов (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, USA). Количественную оценку проводили, используя MultiQuant 3.02 (Sciex). Липиды нормализовали к количеству общего белка. Концентрацию белка измеряли, используя анализ BCA (Pierce). Анализ ЖХ-МС/МС продемонстрировал, что слитые белки ASM-Fc могут снижать уровни эндогенного сфингомиелина в клетках ASM НО обратно до наблюдаемых в клетках дикого типа (Фиг. 14). Кроме того, слитые белки ASM-Fc были также эффективны, как и чистый фермент ASM в отношении снижения сфингомиелина в обоих анализах (Таблица 3).

Таблица 3. Слитые белки ASM-Fc демонстрировали сходную с ASM эффективность в клеточном анализе.

Молекула	EC ₅₀ (ЖХ-МС/МС)	EC ₅₀ (Анализ визуализации)
ASM	0,32 нМ	0,47 нМ
ASM-Fc	0,25 нМ	0,22 нМ

[0377] Вместе эти данные демонстрируют, что слитые белки ASM-Fc сохраняют ферментативную активность и могут устранять накопление субстрата в клетках с дефицитом ASM.

Пример 6. Конструирование слитых белков, содержащих N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH).

Разработка и клонирование

[0378] Конструировали слитые белки SGSH-Fc, которые содержат (i) слитый полипептид, в котором зрелый человеческий фермент SGSH слит с фрагментом человеческого IgG1, который содержит Fc-область («слитый полипептид SGSH-Fc»), и (ii) модифицированный фрагмент человеческого IgG1, который содержит мутации в Fc-области, которые обеспечивают связывание трансферринового рецептора (TfR) («модифицированный Fc-полипептид»). В частности, создавали слитые полипептиды SGSH-Fc, в которых фрагменты SGSH были слиты с N- или C-концом Fc-области человеческого IgG1. В некоторых случаях между фрагментами SGSH и IgG1 помещали линкер, чтобы ослабить какое-либо стерическое несоответствие между двумя фрагментами. Во всех конструкциях выше места слияния был вставлен сигнальный пептид из каппа-цепи V-III, аминокислоты 1-20 (UniProtKB ID - P01661), чтобы облегчить секрецию, а SGSH был усечен так, чтобы состоять из аминокислот R21-L502 (UniProtKB ID - P51688). Используемый фрагмент Fc-области человеческого IgG1 соответствует аминокислотам D104-K330 последовательности в UniProtKB ID P01857 (позиции 221-447, нумерация EU, которая содержит 10 аминокислот шарнирной области (позиции 221-230)). В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид, полученный из остатков человеческого IgG1 D104-K330, содержащий мутации в Fc-области, обеспечивающие связывание TfR, но без слияния с SGSH, котрансфицировали со слитым полипептидом SGSH-Fc с целью создания гетеродимерных слитых белков с одним ферментом SGSH («монозим»). В других вариантах осуществления второй Fc-полипептид, полученный из остатков человеческого IgG1 D104-K330, содержащий мутации в Fc-области, обеспечивающие связывание TfR и слитый с SGSH, котрансфицировали со слитым полипептидом SGSH-Fc с целью создания гетеродимерных слитых белков с двумя ферментами SGSH («бизим»). В некоторых конструкциях фрагменты IgG1 содержали дополнительные мутации для облегчения гетеродимеризации двух Fc-областей. Контрольные слитые белки SGSH-Fc, в которых отсутствуют мутации, обеспечивающие связывание TfR, разрабатывали и конструировали аналогичным образом. В качестве дополнительного контроля мы создали SGSH (аминокислоты R21-L502) с C-концевым гексагистиридиновым тэгом (SEQ ID NO:241) для облегчения обнаружения и очистки.

[0379] Слитые белки SGSH-Fc, имеющие свойство связывания TfR, используемые в примерах, представляют собой димеры, образованные слитым полипептидом SGSH-Fc и модифицированным Fc-полипептидом, который связывается с TfR, причем в модифицированном Fc-полипептиде отсутствует слияние с SGSH («монозим») или же он слит со второй молекулой SGSH («бизим»).

[0380] Слитый полипептид SGSN-Fc, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Fc-полипептида IgG1 с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность SEQ ID NO:149. Фермент SGSN соединяли с Fc-полипептидом линкером GGGGS (SEQ ID NO:239), а N-конец Fc-полипептида содержал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:113).

[0381] Слитый полипептид SGSN-Fc, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с C-концом последовательности Fc-полипептида IgG1 с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность SEQ ID NO:150. Фермент SGSN соединяли с Fc-полипептидом линкером GGGGS (SEQ ID NO:239), а N-конец Fc-полипептида мог содержать часть шарнирной области IgG1 (*например*, SEQ ID NO:113).

[0382] Модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR, содержащий последовательность клона CH3C.35.21.17 (SEQ ID NO:58) с мутациями типа «выступ» и LALA, имеет последовательность SEQ ID NO:151. N-конец модифицированного Fc-полипептида и/или Fc-полипептида может содержать часть шарнирной области IgG1 (*например*, SEQ ID NO:113).

[0383] «N-концевой монозим», содержащий одну молекулу SGSN в N-конце Fc-полипептида, был образован между SEQ ID NO:149 и 151. «C-концевой монозим», содержащий одну молекулу SGSN в C-конце Fc-полипептида, был образован между SEQ ID NO:150 и 151.

[0384] Модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности клона CH3C.35.21.17 (SEQ ID NO:58), с мутациями типа «выступ» и LALA, имеет последовательность SEQ ID NO:154. Фермент SGSN соединяли с модифицированным Fc-полипептидом линкером GGGGS (SEQ ID NO:239), а N-конец модифицированного Fc-полипептида содержал часть шарнирной области IgG1 (SEQ ID NO:113).

[0385] «N-концевой бизим», содержащий первую молекулу SGSN в N-конце Fc-полипептида и вторую молекулу SGSN в N-конце модифицированного Fc-полипептида, был образован между SEQ ID NO:149 и 154.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

[0386] Для экспрессии рекомбинантного фермента SGSN, слитого с Fc-областью, клетки ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) трансфицировали релевантными ДНК-конструкциями, используя набор для трансфекции CHO Expifectamine™ в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Клетки выращивали в среде для экспрессии ExpiCHO™ при 37 °C, 6% CO₂ и 120 об/мин в орбитальном шейкере (Infors HT Multitron). Вкратце, клетки ExpiCHO™ в фазе логарифмического роста трансфицировали при плотности 6×10⁶ клеток/мл 0,8 мкг ДНК-плазмиды на мл объема культуры. После трансфекции температуру клеток снова устанавливали на 37 °C и добавляли в трансфицированные культуры указанный фидер через 18-22 ч после трансфекции. Супернатанты культур трансфицированных клеток собирали через 120 ч после

трансфекции путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 20 мин. Осветленные супернатанты фильтровали (0,22 мкм мембрана) и хранили при 4 °С. Экспрессию содержащего эпитопный тэг фермента SGSN (используемого в качестве контроля) осуществляли, как описано выше, с минимальными модификациями. Вкратце, фермент SGSN, имеющий С-концевой гексагистидиновый тэг (SEQ ID NO:241), экспрессировали в клетках ExpiCHO.

[0387] Слитые белки SGSN-Fc со сконструированными Fc-областями (или без них), обеспечивающими связывание TfR, очищали из супернатантов клеточных культур, используя аффинную хроматографию с протеином А. Супернатанты загружали в аффинную колонку протеином А HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences), используя систему Akta Pure. Затем колонку промывали > 20 объемами колонки (ОК) ФСБ. Связанные белки элюировали, используя 100 мМ цитратный/NaOH буфер с pH 3,0, содержащий 150 мМ NaCl. Сразу после элюирования фракции нейтрализовали, используя буфер на основе 1 М аргинина и 670 мМ сукцината с pH 5,0 (в разведении 1:5). Гомогенность слитых белков SGSN-Fc в элюированных фракциях оценивали с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ.

[0388] Для очистки меченного гексагистидином (SEQ ID NO:241) SGSN проводили исчерпывающий диализ трансфицированных супернатантов против 15 л 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,4, содержащего 100 мМ NaCl, в течение ночи, и добавляли 20 мМ имидазол в прошедшие диализ супернатанты перед очисткой. Прошедшие диализ супернатанты связывали с колонкой HisTrap (GE Healthcare Life Sciences с применением системы Akta Pure). После связывания колонку промывали 20 ОК ФСБ. Связанные белки элюировали, используя ФСБ, содержащий 500 мМ имидазола. Гомогенность фермента SGSN в элюированных фракциях оценивали с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего ДСН-ПААГ. Объединенные фракции, содержащие SGSN, можно разводить 1:10 в 50 мМ Трис, pH 7,5, и дополнительно очищать, используя высокопроизводительную хроматографию с сефарозой Q (GE Healthcare). После связывания колонку промывают 10 ОК 50 мМ Трис, pH 7,5. Связанные белки элюируют, используя линейный градиент до 50 мМ Трис, pH 7,5, и 0,5 М NaCl, и собирают в 1 ОК фракции. Чистоту фракций оценивают с помощью невосстанавливающего ДСН-ПААГ. Очистка позволяет получать гомогенные слитые белки SGSN-Fc и меченный гексагистидином (SEQ ID NO:241) SGSN.

Пример 7. Изучение характеристик слитых белков SGSN.

Слитые белки SGSN-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом связываются с человеческим TfR

[0389] Чтобы определить, влияют ли слитые белки SGSN-Fc со сконструированным связыванием TfR на способность модифицированного Fc-домена взаимодействовать с человеческим TfR, можно оценить аффинность этого белка в отношении человеческого TfR, используя анализ Biacore™ методом поверхностного плазмонного резонанса. Сенсорные чипы CM5 серии S от Biacore™ иммобилизуют с

антителом против Fab человека (набор для захвата Fab человека от GE Healthcare). Проводят захват 5 мкг/мл слитых белков SGSH-Fc в течение 1 минуты в каждой проточной ячейке и вводят серийные 3-кратные разведения апикального домена TfR человека при скорости потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализируют при 3-минутной ассоциации и 3-минутной диссоциации. После каждого ввода чип восстанавливают, используя 10 mM глицин-HCl (pH 2,1). Ответ связывания корректируют путем вычитания ЕО от проточной ячейки с захваченным нерелевантным IgG при такой же плотности. Значения аффинности в стационарном состоянии получают, строя зависимость ответа при равновесии от концентрации, используя программное обеспечение Biacore™ T200 Evaluation Software v3.1. Анализ Biacore™ позволяет установить, что слитые белки SGSH-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом в Fc-области связываются с человеческим TfR.

Слитые белки SGSH-Fc со сконструированным TfR-связывающим сайтом являются активными in vitro и в клетках

[0390] Оценивали *in vitro* и клеточную активность сконструированных TfR-связывающих слитых белков SGSH-Fc, чтобы продемонстрировать, что SGSH сохраняет свою ферментативную активность при слиянии с фрагментом IgG человека. *In vitro* активность рекомбинантного SGSH измеряли с помощью двухэтапного флуориметрического ферментного анализа, используя искусственный субстрат. В частности, 20 мкл субстрата 1 mM натриевой соли 4-метилумбеллиферил 2-дезоксид-2-сульфамино- α -D-глюкопиранозида (Carbosynth Limited, #EM06602), разведенного в аналитическом буфере (0,03 M ацетат натрия, 0,12 M NaCl, pH 6,5), смешивали с 10 мкл 40 нМ SGSH. Первую реакцию инкубировали в течение 17 ч при 37°C и останавливали с помощью 10 мкл 0,2 M фосфатно-цитратного буфера, pH 6,7. Затем начинали вторую реакцию добавлением 10 мкл (0,5 E) дрожжевой α -глюкозидазы (Sigma, #G0660-750UN), инкубировали в течение 24 ч при 37°C и останавливали добавлением 100 мкл 0,5 M натрий-карбонатного буфера, pH 10,3. Затем измеряли флуоресценцию реакционного раствора (возбуждение на 365 нм и испускание на 450 нм). Стандартную кривую 4-метилумбеллиферона аппроксимировали линейной регрессией, чтобы рассчитать количество продукта, и подтверждали как менее 10% общего расщепления субстрата. Специфическую активность (фмоль продукта/мин/пмоль SGSH) рассчитывали путем деления количества продукта на время реакции и молярное количество SGSH.

[0391] Анализ ферментативной активности *in vitro* продемонстрировал, что слитые белки SGSH-Fc были активными, и показал, что слияние Fc-области с SGSH не препятствует ферментативной активности (Фиг. 15).

[0392] Клетки с нокаутом (НО) SGSH создавали, используя CRISPR/CAS9, чтобы получить клеточную систему для исследования клеточной активности сконструированных слитых полипептидов SGSH-Fc. Клетки HEK 293T (ATCC) трансфицировали вектором CRISPR/CAS9 pCas-Guide-EF1a-GFP (Origene), содержащим направляющие последовательности, нацеленные на экзон 2 выше реакционноспособного сайта цистеина,

который создает формилглицин в человеческом SGSN. Для идентификации клеток SGSN НО выращивали одноклеточные клоны и проводили описанный выше анализ фермента SGSN *in vitro* в клеточных лизатах. Вкратце, анализ активности *in vitro* проводили, используя 12,5, 25, 50 и 100 мкг клеточного лизата в аналитическом буфере на основе ацетата свинца, pH 5,0 (100 мМ ацетат натрия, 10 мМ ацетат свинца). Реакцию начинали, объединяя 20 мкл нормализованного клеточного лизата (в воде) с 1 мМ субстратом в 10 мкл буфера (3X) на основе ацетата свинца и инкубировали при 37°C в течение семнадцати часов. Эту первую реакцию останавливали добавлением 70 мкл 4х цитрат-фосфатного буфера, pH 6,7, плюс 0,5 Е NAGLU (Sigma). Реакция продолжалась в течение 24 часов при 37 °С, а затем ее останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М карбоната натрия, pH 10,3. Активность SGSN в CRISPR-клонах HEK293Т сравнивали с рекомбинантным SGSN (R&D), используемым в качестве аналитического стандарта, лизатами HEK дикого типа (ДТ) и лизатами клеток HEK со сверхэкспрессией SGSN. Для клонов с уровнями ферментативной активности, сравнимыми с фоновым сигналом, проводили верификацию последовательности после клонирования мини-Торо (ThermoFisher) и подтверждали их как НО клоны. В последующем клеточном анализе использовали три уникальных и верифицированных клон SGSN НО и три независимые партии клеток HEK293Т ДТ.

[0393] Для исследования клеточной активности чистого фермента SGSN или слитых белков SGSN-Fc разработали гликомический анализ на основе ЖХ-МС/МС, который позволяет отслеживать количество накопления субстрата (гепарансульфата) как показатель активности SGSN. Накопление субстрата измеряли в клетках SGSN НО и клетках HEK293Т ДТ. Клетки SGSN НО и клетки HEK293Т ДТ культивировали в течение 24 часов, три раза промывали ФСБ, осаждали и замораживали. Клеточный осадок обрабатывали ультразвуком в буфере для расщепления дисахаридов (111 мМ NH₄OAc, 11 мМ CaOAc, pH 7,0). Концентрацию белка измеряли, используя анализ BCA (Pierce). Общий белок (100 мкг) добавляли в 100 мкл расщепляющего буфера с 2 мМ ДТТ, 1,25 мМЕ гепариназы I (Galen), 1,25 мМЕ гепариназы II (Galen) и 1,25 мМЕ гепариназы III (Galen). Расщепление гепарансульфата завершали после трех часов при 30 °С, после чего в каждый образец добавляли по 20 нг внутреннего стандарта (4UA-2S-GlcNCOEt-6S HD009 [Galen]). Ферменты дезактивировали добавлением 6 мкл 250 мМ ЭДТК и кипятили образцы при 95°C в течение 10 минут. Затем образцы центрифугировали при 16000 x G в течение 5 минут при комнатной температуре. Супернатант переносили на 30 кДа центрифужный фильтр Amicon Ultra (Millipore) центрифугировали при 14000 x G в течение 15 минут. Дисахариды концентрировали в непрерывном потоке и ресуспендировали в смеси [1:1, об./об.] аналитический буфер:ацетонитрил, которую затем переносили в пробирки для масс-спектрометрии для дополнительного анализа.

[0394] Анализ GAG проводили методом жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA), сопряженной с масс-спектрометрией (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Framingham, MA, USA). В случае каждого анализа 10 мкл образца вводили в колонку ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7 мкм,

2,1×150 мм (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) со скоростью потока 0,4 мл/мин и с температурой колонки 50 °С. Подвижная фаза А состояла из воды с 10 мМ формиатом аммония и 0,1% муравьиной кислотой. Подвижная фаза В состояла из ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Градиент был составлен следующим образом: 0,0-1,0 мин при 85% В, 1,0-5,0 мин от 85% В до 50% В, 5,0-6,0 мин от 50% В до 85% В, 6-8,0 мин выдержка при 85% В. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме отрицательных ионов, применяя следующие настройки: газовая завеса на 30; газ для соударений был установлен на середине; напряжение распыления ионов на -4500; температура на 450; газ-источник ионов 1 на 50; газ-источник ионов 2 на 60. Получение данных проводили, используя Analyst 1.6.3 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (MMP) с временем выдержки 25 (мс). Энергия соударений на -30; потенциал разделения на -80; входной потенциал на -10; ускоряющий потенциал на -10. Обнаружение GAG проводили как [M-H]⁻, используя следующие переходы MMP: D0A0 при m/z 378,1 > 87,0; D0a0 при m/z 378,1 > 175,0; D0S0 при m/z 416,1 > 138,0; D0a4 при m/z 458,1 > 300,0; D0A6, D2A0, D0a6, D2a0 при m/z 458,1 > 97,0; D0S6, D2S0 при m/z 496,0 > 416,1; D2a4, D2a6, D0a10, D2A6 при m/z 538,0 > 458,0; D0S6 при m/z 575,95 > 97,0 4UA-2S-GlcNCOEt-6S при m/z 472,0 (ионный осколок) > 97,0 использовали в качестве внутреннего стандарта (В.С.). GAG идентифицировали на основании времени удержания и совпадения переходов MMP с коммерчески доступными референсными стандартами (Iduron Ltd, Manchester, UK). Количественную оценку проводили, используя MultiQuant 3.0.2 (Sciex) по отношению площадей с В.С. GAG нормализовали к количеству общего белка. Концентрацию белка измеряли, используя анализ ВСА (Pierce).

[0395] Значительное накопление субстрата, отражаемое количеством дисахаридов, наблюдаемых после расщепления гепарансульфата, наблюдали в клетках SGSH HO по сравнению с контрольными линиями клеток (Фиг. 16). С помощью гликомического анализа на основе ЖХ-МС/МС установили, что обработка клеток TfR-связывающими слитыми белками SGSH-Fc снижала уровни полученных из гепарансульфата дисахаридов обратно до наблюдаемых в клетках дикого типа (Фиг. 17). Вместе эти данные демонстрируют, что слитые белки SGSH-Fc сохраняют ферментативную активность и могут снижать накопление субстрата в клетках SGSH HO.

Пример 8. In vitro анализ активности SGSH.

[0396] В этом примере предложен альтернативный анализ активности in vitro для слитых белков SGSH-Fc. Этот анализ адаптировали из Karpova et al., J. Inherit. Metab. Dis., 19:278-285 (1996).

[0397] Стандартные реакционные смеси состояли из 10-15 мкг белка и 20 мкл MU- α -GlcNS (5 или 10 ммоль/л соответственно) в барбитал-натрий-ацетатном буфере Михаэлиса, pH 6,5 (29 ммоль/л барбитала натрия, 29 ммоль/л ацетата натрия, 0,68% (масс./об.) NaCl, 0,02% (масс./об.) азида натрия; pH доведен до 6,5 с помощью HCl), а реакционные смеси инкубировали в течение 17 ч при 37 °С. MU- α -GlcNS доступен от Moscerdam Substrates. После первой инкубации добавляли 6 мкл дважды

концентрированного фосфатного/цитратного буфера Мак-Илвейна, pH 6,7, содержащего 0,02% азида натрия и 10 мкл (0,1 Е) дрожжевой α -глюкозидазы (Sigma) в воде, и проводили вторую инкубацию в течение 24 ч при 37 °С. Длительные инкубации при 37 °С (17-24 ч) проводили в 96-луночных планшетах, которые были герметично запечатаны широкой липкой лентой, ограничивая испарение до < 15%. После этого добавляли 200 мкл 0,5 моль/л Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10,7, и измеряли флуоресценцию высвобождаемого 4-метилумбеллиферона (МУ) на флуориметре Fluoroskan (Titertek). Белок определяли, как было описано ранее (van Diggelen et al., Clin. Chim. Acta., 187:131-139 (1990)).

Пример 9. Модифицированные Fc-полипептиды, которые связываются с TfR.

[0398] В этом примере описаны модификации в Fc-полипептидах для обеспечения свойства связывания трансферринового рецептора (TfR) и переноса через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

[0399] Если не указано иное, позиции аминокислотных остатков в этом разделе пронумерованы на основании системы нумерации EU для Fc-области человеческого IgG1 дикого типа.

Создание и изучение характеристик Fc-полипептидов, содержащих модификации в позициях 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 (клоны СНЗС)

[0400] Дрожжевые библиотеки, содержащие Fc-области, имеющие модификации, внесенные в позиции, включающие аминокислотные позиции 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421, создавали, как описано ниже. Иллюстративные клоны, которые связываются с TfR, приведены в Таблицах 4 и 5.

[0401] После дополнительных двух циклов сортировки одиночные клоны сиквенировали и идентифицировали четыре уникальных последовательности. Эти последовательности содержали консервативный Trp в позиции 388 и все имели ароматический остаток (*m. e.* Trp, Tyr или His) в позиции 421. В остальных позициях наблюдалось сильное разнообразие.

[0402] Четыре клона, выбранных из библиотеки, экспрессировали в виде Fc слияний с фрагментами Fab в клетках CHO или 293 и очищали методами хроматографии с протеином А и эксклюзионной хроматографии, а затем проводили скрининг в отношении связывания с человеческим TfR в присутствии или отсутствии голо-Tf методом ИФА. Все клоны связывались с человеческим TfR, при этом добавление избытка (5 мкМ) голо-Tf не влияло на связывание. Клоны также исследовали в отношении связывания с клетками 293F, которые эндогенно экспрессируют человеческий TfR. Клоны связывались с клетками 293F, хотя связывание в целом было значительно слабее, чем в случае высокоаффинного положительного контроля.

[0403] После этого исследовали, может ли происходит интернализация клонов в TfR-экспрессирующих клетках с применением клона СНЗС.3 в качестве исследуемого клона. Адгезивные клетки НЕК 293 выращивали в 96-луночных планшетах до около 80% конфлюэнтности, удаляли среду и добавляли образцы в 1 мкМ концентрациях: клон СНЗС.3, эталонное положительное контрольное анти-TfR антитело (Ab204), эталонное

отрицательное контрольное анти-BACE1 антитело (Ab107) и человеческий изотипический контрольный IgG (полученный от Jackson ImmunoResearch). Клетки инкубировали при 37 °C и 8% концентрации CO₂ в течение 30 минут, затем промывали, пермеабелизировали 0,1% Тритон™ X-100 и окрашивали вторичным антителом против человеческого IgG, конъюгированным с Alexa Fluor® 488. После дополнительной промывки клетки визуализировали под флуоресцентным микроскопом для одновременного множественного анализа (*m. e.* система Opera Phenix™) и подсчитывали число точек на клетку. При 1 мкМ клон СНЗС.3 демонстрировал сходную способность к интернализации с положительным контрольным анти-TfR, тогда как отрицательные контроли не демонстрировали интернализацию.

Дополнительное конструирование клонов

[0404] Дополнительные библиотеки создавали для улучшения аффинности начальных кандидатов против человеческого TfR, используя подход мягкой рандомизации, в котором создавали олигонуклеотиды ДНК для проведения мягкого мутагенеза на основании каждого из начальных четырех кандидатов. Идентифицировали и отбирали дополнительные клоны, которые связывали TfR. Отобранные клоны можно разделить на две общие группы последовательностей. Клоны группы 1 (*m. e.* клоны СНЗС.18, СНЗС.21, СНЗС.25 и СНЗС.34) имели полуконсервативный Leu в позиции 384, Leu или His в позиции 386, консервативный и полуконсервативный Val в позициях 387 и 389 соответственно и полуконсервативный мотив P-T-W в позициях 413, 416 и 421 соответственно. Клоны группы 2 имели консервативный Tug в позиции 384, мотив TXWSX в позициях 386-390 и консервативный мотив S/T-E-F в позициях 413, 416 и 421 соответственно. Клоны СНЗС.18 и СНЗС.35 использовали в дополнительных исследованиях в качестве репрезентативных представителей каждой группы последовательностей.

Картирование эпитопов

[0405] Чтобы определить, связывались ли сконструированные Fc-области с апикальным доменом TfR, апикальный домен TfR экспрессировали на поверхности фага. Для правильного сворачивания и отображения апикального домена одну из петель необходимо было усечь и провести кольцевую пермутацию последовательности. Клоны СНЗС.18 и СНЗС.35 наносили на ИФА-планшеты и следовали фаговому протоколу ИФА. Вкратце, после промывки и блокирования 1% ФБСА добавляли разведения фагового дисплея и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого планшеты промывали и добавляли анти-M13-HRP, а после дополнительного промывания в планшетах проводили реакцию с ТМБ-субстратом и гасили 2 N H₂SO₄. Оба клона, СНЗС.18 и СНЗС.35, связывались с апикальным доменом в этом анализе.

Картирование паратопов

[0406] Чтобы понять, какие остатки в Fc-домене были наиболее важными для связывания TfR, создавали ряд мутантных Fc-областей клона СНЗС.18 и клона СНЗС.35, в которых каждый мутант содержал одну позицию в TfR-связывающем реестре,

мутированную обратно до дикого типа. Полученные в результате варианты рекомбинантно экспрессировали в виде слияний Fc-Fab и исследовали в отношении связывания с TfR человека и яванского макака. В случае клона СНЗС.35 позиции 388 и 421 были важны для связывания; обратная замена любой из них на дикий тип полностью устраняла связывание с TfR человека.

Характеристики связывания клонов созревания

[0407] ИФА связывания проводили с очищенными слитыми вариантами Fc-Fab с TfR человека или яванского макака, нанесенными на планшет, как описано выше. Варианты из библиотеки созревания клона СНЗС.18, клона СНЗС.3.2-1, клона СНЗС.3.2-5 и клона СНЗС.3.2-19 связывали TfR человека и яванского макака с приблизительно одинаковыми значениями EC_{50} , тогда как родительские клоны СНЗС.18 и СНЗС.35 характеризовались более чем 10-кратно лучшим связыванием с TfR человека по сравнению с яванским макаком.

[0408] После этого исследовали, происходила ли интернализация модифицированных Fc-полипептидов в человеческих и обезьяньих клетках. Используя описанный выше протокол, исследовали интернализацию в клетках НЕК 293 человека и клетках LLC-MK2 резуса. Варианты, которые одинаково связывались с TfR человека и яванского макака, клоны СНЗС.3.2-5 и СНЗС.3.2-19, характеризовались существенно лучшей интернализацией в клетках LLC-MK2 по сравнению с клоном СНЗС.35.

Дополнительное конструирование клонов

[0409] Дополнительное конструирование до клонов СНЗС.18 и СНЗС.35 с дополнительно созревшей аффинностью включало добавление дополнительных мутаций в позиции, которые усиливали связывание посредством прямых взаимодействий, взаимодействий со второй оболочкой или структурной стабилизации. Это осуществляли путем создания и отбора из библиотеки «NNK walk» или «NNK patch». Библиотека NNK walk включала создание, одна за одной, NNK-мутаций остатков, которые находятся вблизи паратопа. Путем визуального изучения структуры Fc, связанного с Fc γ RI (PDB ID: 4W4O), 44 остатка вблизи позиций исходной модификации были идентифицированы как кандидаты для проверки. В частности, следующие остатки наметили для NNK-мутагеза: K248, R255, Q342, R344, E345, Q347, T359, K360, N361, Q362, S364, K370, E380, E382, S383, G385, Y391, K392, T393, D399, S400, D401, S403, K409, L410, T411, V412, K414, S415, Q418, Q419, G420, V422, F423, S424, S426, Q438, S440, S442, L443, S444, P4458, G446 и K447. Было создано 44 одноточечные NNK-библиотеки с применением мутагеза по Кункелю, а продукты объединяли и вносили в дрожжи путем электропорации, как описано выше для других дрожжевых библиотек.

[0410] Объединение этих мини-библиотек (в каждой из которых была мутирована одна позиция с получением в результате 20 вариантов) позволило создать небольшую библиотеку, отбор которой проводили, используя дрожжевой поверхностный дисплей, в отношении любых позиций, которые приводили к связыванию с большей аффинностью. Отбор проводили, как описано выше, используя белки апикального домена TfR. После

трех циклов сортировки сиквенировали клоны из обогащенной дрожжевой библиотеки и идентифицировали несколько позиций «горячих точек», в которых определенные точечные мутации существенно улучшали связывание с белками апикального домена. В случае клона СНЗС.35 эти мутации включали E380 (мутированную на Trp, Tyr, Leu или Gln) и S415 (мутированную на Glu). Последовательности одиночных и комбинированных мутантов клона СНЗС.35 приведены в SEQ ID NO:27-38. В случае клона СНЗС.18 эти мутации включали E380 (мутированную на Trp, Tyr или Leu) и K392 (мутированную на Glu, Phe или His). Последовательности одиночных мутантов клона СНЗС.18 приведены в SEQ ID NO:21-26.

Дополнительные библиотеки созревания для улучшения аффинности клона СНЗС.35

[0411] Создавали дополнительную библиотеку для идентификации комбинаций мутаций из библиотеки NNK walk, добавляя при этом несколько дополнительных позиций в периферии, как описано для предыдущих дрожжевых библиотек. В этой библиотеке мотивы YxTEWSS (SEQ ID NO:242) и TxxExxxxF оставляли постоянными, а шесть позиций полностью рандомизировали: E380, K392, K414, S415, S424 и S426. Позиции E380 и S415 были включены, поскольку они были «горячими точками» в библиотеке NNK walk. Позиции K392, S424 и S426 были включены, поскольку они составляют часть ядра, которое может определять расположение связывающей области, тогда как K414 была выбрана из-за ее близости к позиции 415.

[0412] Сортировку этой библиотеки проводили, как описано ранее, только с апикальным доменом TfR яванского макака. Обогащенный пул сиквенировали после пяти циклов, а последовательности модифицированных областей идентифицированных уникальных клонов приведены в SEQ ID NO:42-59.

[0413] Следующие библиотеки конструировали, чтобы дополнительно исследовать приемлемое разнообразие в основном связывающем паратопе. Каждую из исходных позиций (384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421) плюс две горячие точки (380 и 415) индивидуально рандомизировали с кодонами NNK для создания ряда библиотек однопозиционного насыщающего мутагенеза на дрожжах. Кроме того, каждую позицию индивидуально меняли обратно на остаток дикого типа и отображали эти индивидуальные клоны на дрожжах. Было отмечено, что позиции 380, 389, 390 и 415 были единственными позициями, которые сохраняли существенное связывание с TfR после возвращения к остатку дикого типа (некоторое остаточное, но очень сниженное связывание наблюдали для возвращения 413 к дикому типу).

[0414] Однопозиционные библиотеки NNK сортировали на протяжении трех циклов против апикального домена TfR человека, чтобы получить первые ~ 5% связывающих элементов, а из каждой библиотеки сиквенировали по меньшей мере 16 клонов. Результаты показывают, что в контексте клона СНЗС.35 допустимы аминокислоты в каждой позиции без существенного снижения связывания с человеческим TfR. Обобщенные данные представлены ниже:

Позиция 380; Trp, Leu или Glu;

Позиция 384; Tyr или Phe;

Позиция 386; только Thr;

Позиция 387; только Glu;

Позиция 388; только Trp;

Позиция 389; Ser, Ala или Val (хотя остаток Asn сохраняет некоторую степень связывания, он не появлялся после сортировки библиотеки);

Позиция 390; Ser или Asn;

Позиция 413; Thr или Ser;

Позиция 415; Glu или Ser;

Позиция 416; только Glu; и

Позиция 421; только Phe.

[0415] Вышеуказанные остатки, при замене на них в клоне CH3C.35 по одному или в комбинациях, представляют разнообразие паратопа, при котором сохраняется связывание с апикальным доменом TfR. Клоны, имеющие мутации в этих позициях, включают приведенные в Таблице 5, а последовательности СНЗ-доменов этих клонов приведены в SEQ ID NO:34-38, 58, и 60-90.

Пример 10. Дополнительные Fc-позиции, которые можно модифицировать для обеспечения связывания TfR.

[0416] Создавали дополнительные модифицированные Fc-полипептиды, которые связывают трансферриновый рецептор (TfR), имеющие модификации в альтернативных сайтах Fc-области, *например*, в следующих позициях:

позиции 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288 и 290 (клоны CH2A2);

позиции 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299 (клоны CH2C);

позиции 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294 и 300 (клоны CH2D);

позиции 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331 (клоны CH2E3); или

позиции 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 и 440 (клоны CH3B).

[0417] Иллюстративные клоны CH3B, которые связываются с TfR, приведены в SEQ ID NO:124-128. Иллюстративные клоны CH2A2, которые связываются с TfR, приведены в SEQ ID NO:129-133. Иллюстративные клоны CH2C, которые связываются с TfR, приведены в SEQ ID NO:134-138. Иллюстративные клоны CH2D, которые связываются с TfR, приведены в SEQ ID NO:139-143. Иллюстративные клоны CH2E3, которые связываются с TfR, приведены в SEQ ID NO:144-148.

Пример 11. Способы.

Создание библиотек фагового дисплея

[0418] Синтезировали ДНК-матрицу, кодирующую человеческую Fc-последовательность дикого типа и включали ее в фагмидный вектор. Фагмидный вектор содержал лидерную последовательность *ompA* или *pelB*, вставку Fc, слитую с эпитопными тэгами *c-Myc* и *6xHis* (SEQ ID NO:241), и амбер стоп-кодон, за которым следовал белок оболочки M13 рIII.

[0419] Создавали праймеры, содержащие трикодоны «NNK» в необходимых позициях, где N представляет собой любое основание ДНК (*m. e.* A, C, G или T), а K представляет собой G или T. В альтернативном варианте использовали праймеры для «мягкой» рандомизации, где использовали смесь оснований, соответствующую 70% основания дикого типа и по 10% каждого из остальных трех оснований, для каждой позиции рандомизации. Библиотеки создавали, проводя ПЦР-амплификацию фрагментов Fc-области, соответствующих областям рандомизации, и затем собирали, используя концевые праймеры, содержащие сайты рестрикции SfiI, затем расщепляли SfiI и лигировали в фагидные векторы. В альтернативном варианте использовали праймеры для проведения мутагенеза по Кункелю. Лигированные продукты или продукты по Кункелю трансформировали в электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма TG1 (полученные от Lucigen®). Клетки *E. coli* инфицировали вспомогательным фагом M13K07 после восстановления и выращивали в течение ночи, после чего фаговую библиотеку преципитировали 5% ПЭГ/NaCl, ресуспендировали в 15% глицерине в ФСБ и замораживали до использования. Как правило, размер библиотеки находился в диапазоне от около 10^9 до около 10^{11} трансформантов. Fc-димеры отображали на фаге посредством спаривания между рIII-слитым Fc и растворимым Fc, не присоединенным к рIII (последний создавали благодаря амбер стоп-кодону перед рIII).

Создание библиотек дрожжевого дисплея

[0420] Синтезировали ДНК-матрицу, кодирующую человеческую Fc-последовательность дикого типа и включали ее в вектор дрожжевого дисплея. В случае СН2- и СН3-библиотек Fc-полипептиды отображали на белке клеточной стенки Aga2p. Оба вектора содержали препро-лидерные пептиды с последовательностью расщепления Kex2 и эпитопным тэгом с-Мус, слитым с концом Fc.

[0421] Библиотеки дрожжевого дисплея собирали, используя способы, аналогичные описанным для фаговых библиотек, за исключением того, что амплификацию фрагментов проводили с праймерами, содержащими гомологичные концы для вектора. Свежеприготовленные электрокомпетентные дрожжи (*m. e.* штамм EBY100) электропорировали линейризованным вектором и проводили сборку библиотечных вставок. Способы электропорации должны быть известны специалисту в данной области техники. После восстановления в селективной среде SD-CAA дрожжи выращивали до конфлюэнтности и дважды делили, затем индуцировали для экспрессии белка путем переноса в среду SG-CAA. Как правило, размер библиотеки находился в диапазоне от около 10^7 до около 10^9 трансформантов. Образование Fc-димеров происходило за счет спаривания отображаемых рядом Fc-мономеров.

Общие способы фагового отбора

[0422] Фаговые способы были адаптированы из фагового дисплея: A Laboratory Manual (Barbas, 2001). Дополнительные подробности протокола можно получить по этой ссылке.

Способы сортировки с планшетами

[0423] Антиген наносили на микротитровальные планшеты MaxiSorp[®] (как правило, 1-10 мкг/мл) в течение ночи при 4°C. В каждую лунку добавляли фаговые библиотеки и инкубировали в течение ночи для связывания. Микротитровальные лунки интенсивно промывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин[®] 20 (ФСБТ), и элюировали связанный фаг путем инкубации лунок с кислотой (как правило, 50 mM HCl с 500 mM KCl или 100 mM глицин, pH 2,7) в течение 30 минут. Элюированный фаг нейтрализовали 1 M Трис (pH 8) и амплифицировали, используя клетки TG1 и вспомогательный фаг M13/KO7, и выращивали в течение ночи при 37 °C в среде 2YT, содержащей 50 мкг/мл карбенициллина и 50 мкг/мл канамицина. Титры фага, элюированного из содержащей мишень лунки, сравнивали с титрами фага, восстановленного из не содержащей мишень лунки, чтобы оценить обогащение. Жесткость отбора повышали путем последовательного снижения времени инкубации во время связывания и увеличения времени промывки и числа промывок.

Способы сортировки с гранулами

[0424] Антиген биотинилировали через свободные амины, используя NHS-PEG4-биотин (полученный от Pierce[™]). Для реакций биотинилирования использовали 3-5-кратный молярный избыток реагента биотина в ФСБ. Реакции гасили с помощью Трис с последующим интенсивным диализом в ФСБ. Биотинилированный антиген иммобилизовали на покрытых стрептавидином магнитных гранулах (*m. e.* гранулах M280-стрептавидин, полученных от Thermo Fisher). Библиотеки фагового дисплея инкубировали с покрытыми антигеном гранулами при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем несвязанный фаг удаляли и промывали гранулы ФСБТ. Связанный фаг элюировали путем инкубации с 50 mM HCl, содержащей 500 mM KCl (или 0,1 M глицин, pH 2,7) в течение 30 минут, а затем нейтрализовали и размножали, как описано выше для сортировки в планшетах.

[0425] После трех-пяти циклов пэннинга проводили скрининг одиночных клонов, экспрессируя Fc на фаге или растворимым образом в периплазме *E. coli*. Такие способы экспрессии должны быть известны специалисту в данной области техники. Отдельные фаговые супернатанты или периплазматические экстракты помещали в заблокированные планшеты ИФА, покрытые антигеном или отрицательным контролем, и после этого проводили обнаружение, используя HRP-конъюгированное козье анти-Fc (полученное от Jackson Immunoresearch) для периплазматических экстрактов или анти-M13 (GE Healthcare) для фага, затем проводили реакцию с реагентом ТМБ (полученным от Thermo Fisher). Лунки со значениями ОП₄₅₀, более чем в 5 раз превышающими фон, считали положительными клонами и сиквенировали, после чего некоторые клоны экспрессировали в виде растворимого Fc-фрагмента или слитыми с фрагментами Fab.

Общие способы дрожжевого отбора

Способы сортировки с гранулами (магнитная сортировка клеток (MACS; англ. «magnetic-assisted cell sorting»))

[0426] Отбор методами MACS и FACS проводили так же, как описано в Askerman

et al., *Biotechnol. Prog.*, 25(3):774 (2009). Стрептавидиновые магнитные гранулы (*например*, стрептавидиновые гранулы M-280 от ThermoFisher) метили биотинилированным антигеном и инкубировали с дрожжами (как правило, 5-10х разнообразия библиотеки). Несвязанные дрожжи удаляли, гранулы промывали, а связанные дрожжи выращивали в селективной среде и индуцировали для последующих циклов отбора.

Способы сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS)

[0427] Дрожжи метили анти-с-Мус антителом, чтобы отслеживать экспрессию, и биотинилированным антигеном (концентрация варьировалась в зависимости от цикла сортировки). В некоторых экспериментах антиген предварительно смешивали со стрептавидином-Alexa Fluor[®] 647, чтобы повысить avidность взаимодействия. В других экспериментах проводили обнаружение биотинилированного антигена после связывания и промывки стрептавидином-Alexa Fluor[®] 647. Сортировку синглетных дрожжей со связыванием проводили, используя сортировщик клеток FACS Aria III. Отсортированные дрожжи выращивали в селективной среде и индуцировали для последующих циклов отбора.

[0428] После получения обогащенной дрожжевой популяции дрожжи высевали в содержащие SD-CAA-агар планшеты, а одиночные колонии выращивали и индуцировали для экспрессии, затем метили, как описано выше, чтобы определить их способность связываться с мишенью. Положительные одиночные клоны впоследствии сиквенировали в отношении связывающего антигена, после чего некоторые клоны экспрессировали в виде растворимого Fc-фрагмента или слитыми с фрагментами Fab.

Общие способы скрининга

Скрининг методом ИФА

[0429] Клоны отбирали по результатам пэннинга и выращивали в отдельных лунках 96-луночных глубоких планшетов. Клоны индуцировали для периплазматической экспрессии, используя среду для автоиндукции (полученную от EMD Millipore), или инфицировали вспомогательным фагом для фагового дисплея индивидуальных Fc-вариантов на фаге. Планшеты ИФА покрывали антигеном, как правило, при 0,5 мг/мл в течение ночи, затем блокировали 1% БСА перед добавлением фага или периплазматических экстрактов. После 1 часа инкубации и вымывания несвязанного белка добавляли HRP-конъюгированное вторичное антитело (*т. е.* анти-Fc или анти-M13 для растворимого Fc или отображаемого на фаге Fc соответственно) и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты снова промывали и затем проводили реакцию с реагентом ТМБ и гасили 2 Н серной кислотой. Поглощение на 450 нм количественно определяли, используя планшет-ридер (BioTek[®]), а кривые связывания строили, используя при необходимости программное обеспечение Prism. В некоторых анализах на этапе связывания добавляли растворимый трансферрин или другое конкурентное соединение, как правило, в значительном молярном избытке.

Скрининг методом проточной цитометрии

[0430] Fc-вариантные полипептиды (экспрессируемые на фаге, в периплазматических экстрактах или в растворимом виде как слияния с фрагментами Fab) добавляли к клетками в 96-луночных планшетах с V-образным дном (около 100000 клеток на лунку в ФБС+1% БСА (ФБСА)) и инкубировали при 4 °С в течение 1 часа. Планшеты впоследствии центрифугировали и удаляли среду, а клетки затем один раз промывали ФБСА. Клетки ресуспендировали в ФБСА, содержащем вторичное антитело (как правило, козье антитело против человеческого IgG, конъюгированное с Alexa Fluor[®] 647 (полученное от Thermo Fisher)). Через 30 минут планшеты центрифугировали и удаляли среду, клетки промывали 1-2 раза ФБСА, а затем планшеты считывали на проточном цитометре (*т. е.* проточном цитометре FACSCanto™ II). Медианные значения флуоресценции рассчитывали для каждого условия, используя программное обеспечение FlowJo, а кривые связывания строили с помощью программного обеспечения Prism.

Пример 12. Выбор аффинности TfR-связывающего полипептида

[0431] В этом примере описана взаимосвязь между аффинностью TfR-связывающего полипептида к трансферриновому рецептору (TfR) и получаемым в результате действием на головной мозг терапевтического агента, который связан с TfR-связывающим полипептидом.

[0432] На Фиг. 18 проиллюстрировано, что действие на головной мозг терапевтического агента (оцениваемое путем определения площади под кривой (ППК) зависимости концентрации в головном мозге от времени) было снижено, когда терапевтический агент был связан с полипептидом, который имел относительно большую аффинность к TfR. В частности, действие на головной мозг было существенно снижено, когда терапевтический агент был связан с полипептидом, который имел аффинность к TfR, большую чем около 250 нМ.

[0433] Как проиллюстрировано на Фиг. 19, самую высокую максимальную концентрацию ($C_{\text{макс}}$) в головном мозге наблюдали, когда терапевтический агент был связан с полипептидом, который имел относительно большую аффинность к TfR. В частности, значения $C_{\text{макс}}$ в головном мозге были существенно выше, когда TfR-связывающий полипептид имел аффинность, большую чем около 250 нМ.

[0434] На Фиг. 20 проиллюстрировано отношение $C_{\text{макс}}$ в головном мозге к плазменной концентрации терапевтического агента, слитого с полипептидами, характеризующимися некоторым диапазоном значений аффинности к TfR.

Способы

Создание TfR^{M/c} НИ

[0435] Способы создания мышей с нокином/нокаутом были опубликованы в литературе и хорошо известны специалистам в данной области техники. В целом, мышей TfR^{M/c} НИ создавали, используя технологию CRISPR/Cas9 для экспрессии апикального домена человеческого Tfrc в мышинном гене Tfrc; полученный в результате химерный TfR экспрессировался *in vivo* под управлением эндогенного промотора. Как описано в международной патентной публикации № WO 2018/152285, которая в полном объеме

включена в данный документ посредством ссылки, мышей C57Bl6 использовали для создания линии мышей с нокином апикального TfR человека посредством пронуклеарной микроинъекции в одноклеточные эмбрионы с последующим прививанием эмбрионов псевдобеременным самкам. В частности, Cas9, одиночные направляющие РНК и донорскую ДНК вносили в эмбрионы. Донорская ДНК содержала кодирующую последовательность человеческого апикального домена, которая была кодон-оптимизирована для экспрессии в организме мышей. Кодирующая последовательность апикального домена фланкировалась левым и правым плечами гомологии. Донорскую последовательность конструировали так, чтобы апикальный домен был вставлен после четвертого мышинового экзона и непосредственно фланкировался в 3' конце девятым мышинным экзоном. Самца-родоначальника из потомства самки, которой привили эмбрионы, скрещивали с самками дикого типа для создания гетерозиготных мышей F1. После этого, путем скрещивания гетерозиготных мышей поколения F1 создавали гомозиготных мышей.

Мышиная ФК/ФД

[0436] Для оценки ФК/ФД мышам TfR^{M/C} НИ один раз системно проводили инъекцию при 50 мг/кг через хвостовую вену. Перед перфузией в ЭДТК-пробирки для плазмы набирали кровь посредством пункции сердца и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Затем выделяли плазму для последующего анализа ФК/ФД. Головной мозг экстрагировали после перфузии и выделяли полушария для гомогенизации в 10х по массе ткани 1% NP-40 в ФСБ (для ФК) или 5 M GuHCl (для ФД).

[0437] Количественную оценку концентрации сконструированных TfR-связывающих полипептидов в мышинной плазме и лизатах головного мозга проводили, используя общий анализ человеческого IgG (набор MSD human IgG #K150JLD) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, предварительно покрытые планшеты блокировали в течение 30 минут блокатором MSD А. Образцы плазмы разводили 1:10000, используя жидкостный манипулятор Hamilton Nimbus и добавляли в двух повторностях в заблокированные планшеты. Образцы головного мозга гомогенизировали в 1% лизисном буфере NP-40 и разводили лизаты 1:10 для анализа ФК. Дозирующие растворы также анализировали в том же планшете для подтверждения правильной дозировки. Стандартную кривую, 0,78-200 нг/мл IgG, аппроксимировали, используя четырехпараметрическую логистическую регрессию.

Пример 13. Изучение характеристик связывания вариантов СНЗС с помощью Biacore[™].

[0438] Аффинность вариантов клонов к апикальному домену рекомбинантного TfR определяли методом поверхностного плазмонного резонанса, используя инструмент Biacore[™] T200. Сенсорные чипы CM5 серии S от Biacore[™] иммобилизовали с антителом против Fab человека (набор для захвата Fab человека от GE Healthcare). Проводили захват 5 мкг/мл слияния полипептид-Fab в течение 1 минуты в каждой проточной ячейке и вводили серийные 3-кратные разведения апикального домена человека или яванского

макака при скорости потока 30 мкл/мин при комнатной температуре. Каждый образец анализировали при 45-секундной ассоциации и 3-минутной диссоциации. После каждого ввода чип восстанавливали, используя 10 mM глицин-HCl (pH 2,1). Ответ связывания корректировали путем вычитания ЕО от проточной ячейки с захваченным нерелевантным IgG при такой же плотности. Значения аффинности в стационарном состоянии получали, строя зависимость ответа при равновесии от концентрации, используя программное обеспечение Biacore™ T200 Evaluation Software v3.1.

[0439] Чтобы определить аффинность вариантов клонов к эктодомену (ЭКД) рекомбинантного TfR, сенсорные чипы CM5 серии S от Biacore™ иммобилизовали со стрептавидином. Проводили захват биотинилированного ЭКД TfR человека или яванского макака в течение 1 минуты в каждой проточной ячейке и вводили серийные 3-кратные разведения вариантов клонов при скорости потока 30 мкл/мин при комнатной температуре. Каждый образец анализировали при 45-секундной ассоциации и 3-минутной диссоциации. Ответ связывания корректировали путем вычитания ЕО от проточной ячейки без ЭКД TfR при такой же плотности. Значения аффинности в стационарном состоянии получали, строя зависимость ответа при равновесии от концентрации, используя программное обеспечение Biacore™ T200 Evaluation Software v3.1.

[0440] Значения аффинности связывания обобщены в Таблице 6. Значения аффинности были получены с помощью аппроксимации стационарного состояния.

Таблица 6. Значения аффинности связывания для типовых вариантов СНЗС

Клон	TfR человека (мкМ)	TfR яванского макака (мкМ)	Апикальный домен TfR человека (мкМ)	Апикальный домен TfR яванского макака (мкМ)
СНЗС.35.19.mono	0,4	5,9	0,37	5,6
СНЗС.35.20.mono	0,25	6,7	0,17	8
СНЗС.35.21.mono	0,1	2,1	0,12	2,2
СНЗС.35.24.mono	0,29	3,3	0,23	3
СНЗС.35.21.11.mono	0,24	4	0,13	2,2
СНЗС.35.21.16.mono	0,18	1,8	0,12	1,9
СНЗС.35.21.17.mono	0,3	2,9	0,13	2,6
СНЗС.35.mono	0,61	> 10	0,61	> 10
СНЗС.35.N153.mono	0,42	> 10	0,95	> 10
СНЗС.35.bi	0,22	> 2	не исследовано	не исследовано
СНЗС.35.N153.bi	0,37	3,3	не исследовано	не исследовано

СНЗС.3.2-19.bi	5,2	5,6	не исследовано	не исследовано
СНЗС.35.19.bi	0,074	1,5	не исследовано	не исследовано
СНЗС.35.20.bi	0,054	1,7	не исследовано	не исследовано
СНЗС.35.21.bi	0,049	0,7	не исследовано	не исследовано
СНЗС.35.24.bi	0,061	0,65	не исследовано	не исследовано

Пример 14. ФК/ФД в головном мозге и плазме слияний полипептид-Fab у мышей Tfr^{M/q}: СНЗС.35.21, СНЗС.35.20, СНЗС.35, СНЗС.35.23, СНЗС.35.23.3.

[0441] Чтобы оценить влияние аффинности связывания Tfr на ФК и поглощение в головном мозге, создавали анти-BACE1 Ab153 и Tfr-связывающие слитые полипептиды (слияния СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153, СНЗС.35:Ab153), которые отличались по аффинности связывания с апикальным доменом Tfr человека по данным Biacore™. Значения аффинности связывания слияний СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153, СНЗС.35:Ab153 с человеческим Tfr составляют 100 нМ, 170 нМ и 620 нМ, соответственно. Мышам Tfr^{M/q} с нокином системно вводили Ab153 или слияния полипептид-Fab при 50 мг/кг, и оценивали ФК в плазме и ФК/ФД в головном мозге через 1, 3 и 7 суток после введения дозы. ФК/ФД анализ головного мозга и плазмы проводили, как описано выше. Вследствие экспрессии Tfr в периферических тканях слияния СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153 и СНЗС.35:Ab153 демонстрировали более быстрый клиренс, чем одно Ab153, что согласуется с мишень-опосредованным клиренсом и указывает на связывание Tfr in vivo (Фиг. 21А). Что поразительно, концентрации слияний СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153 и СНЗС.35:Ab153 в головном мозге были существенно повышены по сравнению с Ab153, с достижением максимальной концентрации в головном мозге более 30 нМ через 1 сутки после введения дозы по сравнению с всего лишь около 3 нМ для Ab153 в тот же самый момент времени (Фиг. 21В). Повышение действия на головной мозг слияний СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153 и СНЗС.35:Ab153 приводило к уровням эндогенного мышинового Аβ в головном мозге мышей, на около 55-60% меньшим по сравнению с уровнями Аβ у мышей, которым вводили Ab153 (Фиг. 21С). Более низкие уровни Аβ в головном мозге сохранялись, пока концентрации слияний СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153 и СНЗС.35:Ab153 оставались повышенными в головном мозге, и возвращались к уровням, сходным с наблюдаемыми у обработанных Ab153 мышей, когда действие снижалось на 7 сутки. Снижение действия в головном мозге со временем коррелирует со снижением периферического действия слияний СНЗС.35.21:Ab153, СНЗС.35.20:Ab153 и

СНЗС.35:Ab153, показывая четкую взаимосвязь ФК/ФД in vivo (сравните Фиг. 21А и 21С). Кроме того, общие уровни TfR в головном мозге были сравнимы для обработанных Ab153 и обработанных слиянием полипептид-Fab мышей после этой единственной высокой дозы, показывая отсутствие существенного влияния повышенного действия на головной мозг слияний полипептид-Fab на экспрессию TfR в головном мозге (Фиг. 21D).

[0442] В случае несоответствия, аминокислотные замены для каждого клона, описанные в Таблицах (например, Таблице 5), определяют аминокислотные замены в указанных позициях этого клона для аминокислот из набора последовательностей, приведенного в Перечне последовательностей.

[0443] Следует понимать, что описанные в данном документе примеры и варианты осуществления предназначены исключительно в иллюстративных целях и что специалистам в данной области техники будут предложены различные модификации или изменения на их основе, которые должны быть включены в суть и сферу действия этой заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Последовательности номеров доступа последовательностей, цитируемых в данном документе, включены посредством ссылки.

Таблица 4. Модификации СНЗ-домена.

Название клона	Группа	384	385	386	387	388	389	390	391	...	413	414	415	416	417	418	419	420	421
Дикий тип	№/а	N	G	Q	P	E	N	N	Y	...	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
1		L	G	L	V	W	V	G	Y	...	A	K	S	T	W	Q	Q	G	W
2		Y	G	T	V	W	S	H	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	Y
3		Y	G	T	E	W	S	Q	Y	...	E	K	S	D	W	Q	Q	G	H
4		V	G	T	P	W	A	L	Y	...	L	K	S	E	W	Q	Q	G	W
17	2	Y	G	T	V	W	S	K	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
18	1	L	G	H	V	W	A	V	Y	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
21	1	L	G	L	V	W	V	G	Y	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
25	1	M	G	H	V	W	V	G	Y	...	D	K	S	T	W	Q	Q	G	W
34	1	L	G	L	V	W	V	F	S	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
35	2	Y	G	T	E	W	S	S	Y	...	T	K	S	E	W	Q	Q	G	F
44	2	Y	G	T	E	W	S	N	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
51	1/2	L	G	H	V	W	V	G	Y	...	S	K	S	E	W	Q	Q	G	W
3.1-3	1	L	G	H	V	W	V	A	T	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
3.1-9	1	L	G	P	V	W	V	H	T	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
3.2-5	1	L	G	H	V	W	V	D	Q	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
3.2-19	1	L	G	H	V	W	V	N	Q	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W

3.2-1	1	L	G	H	V	W	V	N	F	...	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Таблица 5. Дополнительные модификации СНЗ-домена.

Название клона	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
	Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V
35.20.1	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
35.20.2	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
35.20.3	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
35.20.4	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
35.20.5	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
35.20.6	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.a.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.a.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.a.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.a.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
35.21.a.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.a.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
35.23.1	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
35.23.2	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
35.23.3	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
35.23.4	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
35.23.5	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
35.23.6	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
35.24.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
35.24.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
35.24.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
35.24.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
35.24.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.
35.24.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.
35.21.17.	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
35.21.17.	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.

35.21.17. 3	. . L . . . Y . T E W V S T . E E F . . .
35.21.17. 4	. . L . . . Y . T E W S S S . E E F . . .
35.21.17. 5	. . L . . . F . T E W A S T . E E F . . .
35.21.17. 6	. . L . . . F . T E W V S T . E E F . . .
35,20 Y . T E W S S T . E E F . . .
35,21	. . W . . . Y . T E W S S T . E E F . . .
35,22	. . W . . . Y . T E W S T . . E F . . .
35,23 Y . T E W S T . E E F . . .
35,24	. . W . . . Y . T E W S T . E E F . . .
35.21.17	. . L . . . Y . T E W S S T . E E F . . .
35.N390 Y . T E W S T . . E F . . .

Неформальный перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательности
1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc человека дикого типа, позиции 231-447 по системе нумерации EU
2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	Последовательность CH2-домена, позиции 231-340 по системе нумерации EU
3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность CH3-домена,

		позиции 341-447 по системе нумерации EU
4	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGLV WVGKYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVAKSTWQQGWVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.1
5	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGT VWSHYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGYVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.2
6	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGT WSQYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGHVFSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.3
7	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESVGT WALYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVLKSEWQQGWVFSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.4
8	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGT VWSKYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.17

9	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.18
10	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGLV WVGKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.21
11	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESMGH VWVGKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.25
12	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGLV WVFSKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.34
13	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.35
14	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS</p>	Клон CH3C.44

	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
15	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWVGKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.51
16	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWVATKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.3.1-3
17	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGPV WVHTKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.3.1-9
18	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWVDQKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.3.2-5
19	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWVNQKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.3.2-19

20	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWVNFKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.3.2-1</p>
21	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVWESLGH VWAVYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>
22	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESLGH VWAVYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>
23	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVYWESLGH VWAVYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>
24	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYQTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>
25	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYFTTPVLDSGDSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFC</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>

	SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
26	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYHTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Вариант клона CH3C.18</p>
27	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESLGH VWAVYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.13</p>
28	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.14</p>
29	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESLGH VWAVYQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.15</p>
30	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESLGH VWVNQKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.16</p>
31	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH</p>	<p>Клон CH3C.35.17</p>

	VWVNQQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
32	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESLGH VWVNQQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.18
33	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.19
34	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGT WSSYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20
35	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFCSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21
36	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFCSCS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.22
37	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	Клон CH3C.35.23

	VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VEWESYGTE WSNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
38	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VVWESYGT EWSNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24
39	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VEWESYGTE WSNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N163
40	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VEWESYGTE WSSYQTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.K165 Q
41	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VEWESYGTE WSNYQTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N163. K165Q
42	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPDIA VLWESYGTE WSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.1
43	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	Клон CH3C.35.21.2

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
44	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.3
45	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.4
46	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFCW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.5
47	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.6
48	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFTCW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.7
49	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED	Клон

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFTCG VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.35.21.8
50	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFECW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.9
51	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFKCW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.10
52	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTPEEWQQGFVFKCW VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.11
53	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVWESYGT EWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.12
54	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVWESYGT EWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.13

55	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREETWQQGFVFTC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.14
56	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGEEWQQGFVFTC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.15
57	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREETWQQGFVFTC GVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.16
58	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17
59	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.18
60	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCS	Клон CH3C.35.20.1

	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
61	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.20.2</p>
62	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.20.3</p>
63	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.20.4</p>
64	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.20.5</p>
65	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.20.6</p>
66	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT</p>	<p>Клон CH3C.35.21.a.1</p>

	EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
67	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.2
68	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.3
69	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.4
70	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.5
71	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT EWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.6
72	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	Клон CH3C.35.23.1

	VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
73	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2
74	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3
75	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4
76	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.5
77	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTE WVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.6
78	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	Клон CH3C.35.24.1

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
79	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.2
80	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.3
81	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.4
82	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT EWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.5
83	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFGT EWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.6
84	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED	Клон

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.35.21.17. 1
85	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2
86	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 3
87	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTE WSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 4
88	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 5
89	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFGTE WVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 6

90	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Клон CH3C.35.N390
91	<p>MPPPRTRGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNV LLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFA QQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFST IPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPY HPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLP DKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKE FQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVA YNPWMDIRQREDV QALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLS ALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSNFDVAT HVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGR QSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREG KNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQW NSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFS DIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP</p>	Полипептидная последовательн ость полноразмерно й идуронатсульф атазы (IDS) человека
92	<p>TDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLF QNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVH AGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYS WSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDV PEGTLPDKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIP FRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVA YNPWMDIR QREDVQALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQV GRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEGEWAKYSN FDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQL MEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHV ELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRP SDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDE FLANFS DIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLL MP</p>	Полипептидная последовательн ость зрелой идуронатсульф атазы (IDS) человека
93	MEFSSPSREECPKPLSRV SIMAGSLTGLLLLQAVSWASGA	Полипептидная

	<p>RPCIPKSFQYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYES TRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVP MASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHR ALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQGP GDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAG LLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHHNVRL MLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLD LAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPN WVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQ RVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPL TIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ</p>	<p>последовательность полноразмерной β- глюкоцереброз идазы человека</p>
94	<p>ARPCIPKSFQYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYE STRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRV PMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIH RALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQGP PGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSA GLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHHNVRL LMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLD FLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRL GSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPN WVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQ RVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPL TIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ</p>	<p>Полипептидная последовательность зрелой β- глюкоцереброз идазы человека</p>
95	<p>EPKSCDKTHTCPPCP</p>	<p>Аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека</p>
96	<p>MMDQARSAFNSLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEM KLAVDDEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFL</p>	<p>Белок трансферри-</p>

	IGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPA ARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREA GSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDS AQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLV HANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAES LNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGF PSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDPC SDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK GFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGA AKSGVGTALLKLAQ MFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEGY LSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTM QNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYS GIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQ YRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKT DRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGS GSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQ GAANALSGDVWDIDNEF	нового рецептора 1 (TFR1) человека
97	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21 с мутацией типа «выступ»
98	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21 с мутациями типа «выступ» и LALA
99	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21 с мутациями типа «выступ» и YTE

	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
100	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон СНЗС.35.21 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
101	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутациями типа «впадина»
102	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутациями LALA
103	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутациями типа «впадина» и YTE
104	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
105	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVWVESYGT	Клон СНЗС.35.21 мутациями типа «впадина»

	EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
106	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.21 с мутациями типа «впадина» и LALA
107	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.21 с мутациями типа «впадина» и YTE
108	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVWVESYGT EWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.21 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
109	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутацией типа «выступ»
110	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последователь ность Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
111	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	Последователь ность Fc с мутациями

	VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	типа «выступ» и YTE
112	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
113	DKTHTCPPCP	Часть последовательности шарнирной области IgG1 человека
114	SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYG DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAV <u>CA</u> PSRVSFLTGR RPDTRRLYDF NSYWRVHAGN FSTIPQYFKE NGYVTMSVGK VFHPGISSNH TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD GELHANLLCP VDVLDPVEGT LPDKQSTEQA IQLLEKMKTS ASPFFLAUGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV PDGLPPVAYN PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDVQRFK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH GWALGEGHEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE KLFYLDLDFD SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVP SFHVELCREG KNLLKHFRFR DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI DYRYTVWVGF NPDEFANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP	Последовательность IDS (цистеин, модифицированный до формилглицина дважды подчеркнут)
115	<u>SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYG</u> <u>DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAV<u>CA</u></u>	Слитый полипептид

	<u>PSRVSFLTGR</u> <u>RPDTTRLYDF</u> <u>NSYWRVHAGN</u> <u>FSTIPQYFKE</u> <u>NGYVTMSVGK</u> <u>VFHPGISSNH</u> <u>TDDSPYSWSF</u> <u>PPYHPSSEKY</u> <u>ENTKTCRGPD</u> <u>GELHANLLCP</u> <u>VDVLDVPEGT</u> <u>LPDKQSTEOA</u> <u>IQLLEKMKTS</u> <u>ASPFFLAVGY</u> <u>HKPHIPFRYP</u> <u>KEFQKLYPLE</u> <u>NITLAPDPEV</u> <u>PDGLPPVAYN</u> <u>PWMDIRQRED</u> <u>VQALNISVPY</u> <u>GPIPVDFOQK</u> <u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u> <u>GWALGEGHEW</u> <u>AKYSNFDVAT</u> <u>HVPLIFYVPG</u> <u>RTASLPEAGE</u> <u>KLFPYLDPDF</u> <u>SASQLMEPGR</u> <u>QSMDLVELVS</u> <u>LFPTLAGLAG</u> <u>LQVPPRCVP</u> <u>SFHVELCREG</u> <u>KNLLKHFRFR</u> <u>DLEEDPYLPG</u> <u>NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</u> <u>DYRYTVWVGF</u> <u>NPDEFANFS</u> <u>DIHAGELYFV</u> <u>DSDPLQDHNM</u> <u>YNDSQGGDLF</u> <u>QLLMPGGGGS</u> DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS (цистеин, модифицирова нный до формилглицин а дважды подчеркнут) и мутациями типа «впадина» и LALA
116	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVW WESYGTEWSS YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVTKEEWQQG FVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	Клон CH3C.35.21 с мутациями типа «выступ» и LALA и частью последовательн ости шарнирной области IgG1 человека

117	<u>SETQANSTTD</u>	<u>ALNVLLIIVD</u>	<u>DLRPSLGCYG</u>	Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS (цистеин, модифицирова нный до формилглицин а дважды подчеркнут) и мутациями типа «впадина»
	<u>DKLVRSPNID</u>	<u>QLASHSLLFQ</u>	<u>NAFAQQAVCA</u>	
	<u>PSRVSFLTGR</u>	<u>RPDTTRLYDF</u>	<u>NSYWRVHAGN</u>	
	<u>FSTIPQYFKE</u>	<u>NGYVTMSVGK</u>	<u>VFHPGISSNH</u>	
	<u>TDDSPYSWSF</u>	<u>PPYHPSSEKY</u>	<u>ENTKTCRGPD</u>	
	<u>GELHANLLCP</u>	<u>VDVLDVPEGT</u>	<u>LPDKQSTEQA</u>	
	<u>IQLLEKMKTS</u>	<u>ASPFFLAVGY</u>	<u>HKPHIPFRYP</u>	
	<u>KEFQKLYPLE</u>	<u>NITLAPDPEV</u>	<u>PDGLPPVAYN</u>	
	<u>PWMDIRQRED</u>	<u>VQALNISVPY</u>	<u>GPIPVDFOQK</u>	
	<u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u>			
	<u>GWALGEHGEW</u>	<u>AKYSNFDVAT</u>	<u>HVPLIFYVPG</u>	
	<u>RTASLPEAGE</u>	<u>KLFPYLDPDF</u>	<u>SASQLMEPGR</u>	
	<u>QSMDLVELVS</u>	<u>LFPTLAGLAG</u>	<u>LQVPPRCVP</u>	
	<u>SFHVELCREG</u>	<u>KNLLKHFRFR</u>	<u>DLEEDPYLPG</u>	
	<u>NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</u>			
	<u>DYRYTVWVGF</u>	<u>NPDEFLANFS</u>	<u>DIHAGELYFV</u>	
	<u>DSDPLQDHNM</u>	<u>YNDSQGGDLF</u>	<u>QLLMPGGGGS</u>	
	<u>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT</u>			
	<u>CVVVVDVSHED</u>	<u>PEVKFNWYVD</u>	<u>GVEVHNAKTK</u>	
	<u>PREEQYNSTY</u>	<u>RVVSVLTVLH</u>	<u>QDWLNGKEYK</u>	
<u>CKVSNKALPA</u>	<u>PIEKTISKAK</u>	<u>GQPREPQVYT</u>		
<u>LPPSRDELTK</u>	<u>NQVSLSCAVK</u>	<u>GFYPSDIAVE</u>		
<u>WESNGQPENN</u>	<u>YKTTTPVLDS</u>	<u>DGSFFLVSKL</u>		
<u>TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK</u>				
118	<u>SETQANSTTD</u>	<u>ALNVLLIIVD</u>	<u>DLRPSLGCYG</u>	Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS (цистеин, модифицирова нный до формилглицин а дважды
	<u>DKLVRSPNID</u>	<u>QLASHSLLFQ</u>	<u>NAFAQQAVCA</u>	
	<u>PSRVSFLTGR</u>	<u>RPDTTRLYDF</u>	<u>NSYWRVHAGN</u>	
	<u>FSTIPQYFKE</u>	<u>NGYVTMSVGK</u>	<u>VFHPGISSNH</u>	
	<u>TDDSPYSWSF</u>	<u>PPYHPSSEKY</u>	<u>ENTKTCRGPD</u>	
	<u>GELHANLLCP</u>	<u>VDVLDVPEGT</u>	<u>LPDKQSTEQA</u>	
	<u>IQLLEKMKTS</u>	<u>ASPFFLAVGY</u>	<u>HKPHIPFRYP</u>	
	<u>KEFQKLYPLE</u>	<u>NITLAPDPEV</u>	<u>PDGLPPVAYN</u>	
	<u>PWMDIRQRED</u>	<u>VQALNISVPY</u>	<u>GPIPVDFOQK</u>	
	<u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u>			
	<u>GWALGEHGEW</u>	<u>AKYSNFDVAT</u>	<u>HVPLIFYVPG</u>	

	<p>RTASLPEAGE KLFYLDLDPFD SASQLMEPGR</p> <p>QSMDELVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVP</p> <p>SFHVELCREG KNLLKHFRFR DLEEDPYLPG</p> <p>NPRESLIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</p> <p>DYRYTVWVGF NPDEFANFS DIHAGELYFV</p> <p>DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMPGGGGS</p> <p>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT</p> <p>CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK</p> <p>PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK</p> <p>CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT</p> <p>LPPSRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE</p> <p>WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL</p> <p>TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	<p>подчеркнут) и мутацией типа «выступ»</p>
119	<p>MSCPVPACCALLLVGLCRARPRNALLLADDGGFESGA</p> <p>YNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTG</p> <p>LPQHQNGLMYGLHQDVHFNFSFDKVRSLPLLLSQAGVRT</p> <p>GIIGKKHVGPEVYVYDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLL</p> <p>VRKFLQTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</p> <p>GNGESGMGRIPDWPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARAD</p> <p>LAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSD</p> <p>NGIPFSGRTNLYWPGTAEPVSSPEHPKRWGQVSEAY</p> <p>VSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHILTGRSLLPALEA</p> <p>EPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNF</p> <p>KMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYY</p> <p>YRARWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLA</p> <p>KWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPPCQPLHNEL</p>	<p>Полипептидная последовательн ость полноразмерно й сульфоглюкоза мин сульфогидрола зы человека</p>
120	<p>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLF</p> <p>RNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNGLMYGLHQDVHFN</p> <p>SFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYDFAYT</p> <p>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFPLYVAFHD</p> <p>PHRCGHSQPQYGTFCCKFNGESGMGRIPDWPQAYDPL</p> <p>DVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQE</p> <p>LRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPVSS</p> <p>PEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</p> <p>SKTIHILTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPM</p>	<p>Полипептидная последовательн ость зрелой сульфоглюкоза мин сульфогидрола зы человека</p>

	RSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTT AGQPTGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEK LSPQCQPLHNEL	
121	MPRYGASLRQSCPRSGREQGQDGTAGAPGLLWMGLVLA LALALALALS DSRVLWAPAEAHPLSPQGHPARLHRIVPR LRDVFVGWGNLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAI KLCNLLKIAPPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEAC GLLLGSTCGHWDIFSSWNISLPTVPKPPP KPPSPPAPGAPV SRILFLTDLHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPASR PGAGYWGEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWT GDIPAHDVWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYP AVGNHSTPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWL PAEALRTL RIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFWLLI NSTDPAGQLQWL VGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLK SWSWNYRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETL SRPLAV AFLAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVL DHETYILNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTA WHNLVYRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPSEPCGTPCRL ATLCAQLSARADSPALCRHLM PDGSLPEAQLSWPRPLFC	Полипептидная последовательность полноразмерной кислой сфингомиелина зрелого человека
122	LSDSRVLWAPAEAHPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFVGW NLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKI APPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGST CGHWDIFSSWNISLPTVPKPPP KPPSPPAPGAPVSRILFLTD LHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPASRPGAGYW GEYSKCDLPLRTLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHD VWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHES TPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFWLLINSTDPA GQLQWL VGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNY YRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAV AFLAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVL DHETYI LNLTQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTA WHNLV YRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPSEPCGTPCRL ATLCA QLSARADSPALCRHLM PDGSLPEAQLSWPRPLFC	Полипептидная последовательность зрелой кислой сфингомиелина зрелого человека

123	<p>LSDSRVLWAPAEAHPLSPQGHPARLHRIVPRLRDVFGWG NLTCPICKGLFTAINLGLKKEPNVARVGSVAIKLCNLLKI APPAVCQSIVHLFEDDMVEVWRRSVLSPSEACGLLLGST CGHWDIFSSWNISLPTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILFLTD LHWDHDYLEGTDPCADPLCCRRGSGLPASRPGAGYW GEYSKCDLPLRTLLESLLSGLGPAGPFDMVYWTGDIPAHD VWHQTRQDQLRALTTVTALVRKFLGPVPVYPAVGNHES TPVNSFPPPFIEGNHSSRWLYEAMAKAWEPWLP AEALRT LRIGGFYALSPYPGLRLISLNMNFC SRENFWLLINSTDPAG QLQWLVGELQAAEDRGDKVHIIGHIPPGHCLKSWSWNY YRIVARYENTLAAQFFGHTHVDEFEVFYDEETLSRPLAV AFLAPSATTYIGLNPGYRVYQIDGNYSGSSHVVDHETYI LNL TQANIPGAIPHWQLLYRARETYGLPNTLPTAWHNLV YRMRGDMQLFQTFWFLYHKGHPPSEPCGTPCRLATLCA QLSARADSPALCRHLM PDGSLPEAQ</p>	<p>Полипептидная последовательность усеченной кислоты сфингомиелина человека</p>
124	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDY VTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYGFHDLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3B.1</p>
125	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDM VTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYGFHDLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3B.2</p>
126	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEY VTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYGFHDLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3B.3</p>
127	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</p>	<p>Клон CH3B.4</p>

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEM VTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYGFHDLSPGK	
128	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEL VTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYGFHDLSPGK	Клон CH3B.5
129	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVEFIWYVDGVDVRYEWQLPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSPGK	Клон CH2A2.1
130	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVGFVWYVDGVPVSWEWYWPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSPGK	Клон CH2A2.2
131	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFDWYVDGVMVRREWHRPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSPGK	Клон CH2A2.3
132	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVSFEWYVDGVPVRWEWQWPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSPGK	Клон CH2A2.4
133	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED	Клон CH2A2.5

	PEVAFTWYVDGVPVRWEWQNPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
134	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPP WEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2C.1
135	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPSPPPW EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2C.2
136	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPP WEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2C.3
137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDFRGPP WEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYHDYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2C.4
138	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTVP WEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2C.5

139	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVPP RMVKFNWYVDGVEVHNAKTKSLTSQHNSTVRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2D.1
140	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVPP WMVKFNWYVDGVEVHNAKTKSLTSQHNSTVRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2D.2
141	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDM WEYVKFNWYVDGVEVHNAKTKPWVKQLNSTWRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2D.3
142	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDW TWVKFNWYVDGVEVHNAKTKPWIAQPNSTWRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2D.4
143	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDW EWVKFNWYVDGVEVHNAKTKPWKLQLNSTWRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2D.5
144	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PWVWFYWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCSVNIALWWSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	Клон CH2E3.1

	CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
145	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PVVGFRWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCRVNSALTWKIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2E3.2
146	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PVVGFRWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCRVNSALSALRWRIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2E3.3
147	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PIVGFRWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCRVNSALRWRIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2E3.4
148	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PAVGFEWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCRVNSALRWRIEKTISKAKGQPREPQ QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH2E3.5
149	<u>RPRNALLLA</u> <u>DDGGFESGAY</u> <u>NNSAIATPHL</u> <u>DALARRSLLF</u> <u>RNAFTSVSSC</u> <u>SPSRASLLTG</u> <u>LPQHONGMYG</u> <u>LHQDVHHFNS</u> <u>FDKVRSLPLL</u> <u>LSQAGVRTGI</u> <u>IGKKHVGPE</u> <u>VYPDFAYTE</u> <u>ENGSVLQVGR</u> <u>NITRIKLLVR</u> <u>KFLQTQDDRP</u> <u>FFLYVAFHDP</u> <u>HRCGHSQPQY</u> <u>GTFCEKFGNG</u> <u>ESGMGRIPDW</u> <u>TPQAYDPLDV</u> <u>LVPYFVPNTP</u> <u>AARADLAAQY</u> <u>TTVGRMDQGV</u> <u>GLVLQELRDA</u> <u>GVLNDTLVIF</u> <u>TSDNGIPFPS</u> <u>GRTNLYWPGT</u> <u>AEPLLVSSE</u> <u>HPKRWGQVSE</u> <u>AYVSLDLTP</u> <u>TILDWFSIPY</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc с последовательн остью зрелого SGSH человека (подчеркнута), слитой с N- концом последовательн

	<u>PSYAIFGSKT</u>	<u>IHLTGRSLLP</u>	<u>ALEAEPLWAT</u>	ости Fc с мутациями типа «впадина» и LALA
	<u>VFGSQSHHEV</u>	<u>TMSYPMRSVQ</u>	<u>HRHFRLVHNL</u>	
	<u>NFKMPFPIDQ</u>	<u>DFYVSPTFQD</u>	<u>LLNRTTAGQP</u>	
	<u>TGWYKDLRHY</u>	<u>YYRARWELYD</u>	<u>RSRDPHETQN</u>	
	<u>LATDPRFAQL</u>	<u>LEMLRDQLAK</u>	<u>WQWETHDPWV</u>	
	<u>CAPDGVLEEK</u>	<u>LSPQCQPLHN</u>	<u>ELGGGGSDKT</u>	
	<u>HTCPPCPAPE</u>	<u>AAGGPSVFLF</u>	<u>PPKPKDTLMI</u>	
	<u>SRTPEVTCVV</u>	<u>VDVSHEDPEV</u>	<u>KFNWYVDGVE</u>	
	<u>VHNAKTKPRE</u>	<u>EQYNSTYRVV</u>	<u>SVLTVLHQDW</u>	
	<u>LNGKEYKCKV</u>	<u>SNKALPAPIE</u>	<u>KTISKAKGQP</u>	
	<u>REPQVYTLPP</u>	<u>SRDELTKNQV</u>	<u>SLSCAVKGFY</u>	
	<u>PSDIAVEWES</u>	<u>NGQPENNYKT</u>	<u>TPPVLDSDGS</u>	
	<u>FFLVSKLTVD</u>	<u>KSRWQQGNVF</u>	<u>SCSVMHEALH</u>	
	<u>NHYTQKSLSL</u>	<u>SPGK</u>		
150	<u>APEAAGGPSV</u>	<u>FLFPPKPKDT</u>	<u>LMISRTPEVT</u>	
	<u>CVVVDVSHED</u>	<u>PEVKFNWYVD</u>	<u>GVEVHNAKTK</u>	
	<u>PREEQYNSTY</u>	<u>RVVSVLTVLH</u>	<u>QDWLNGKEYK</u>	
	<u>CKVSNKALPA</u>	<u>PIEKTISKAK</u>	<u>GQPREPQVYT</u>	
	<u>LPPSRDELTK</u>	<u>NQVSLSCAVK</u>	<u>GFYPSDIAVE</u>	
	<u>WESNGQPENN</u>	<u>YKTPPVLDS</u>	<u>DGSFFLVSKL</u>	
	<u>TVDKSRWQQG</u>	<u>NVFSCSVMHE</u>	<u>ALHNHYTQKS</u>	
	<u>LSLSPGKGGG</u>	<u>GSRPRNALL</u>	<u>LADDGGFESG</u>	
	<u>AYNNSAIATP</u>	<u>HLDALARSL</u>	<u>LFRNAFTSVS</u>	
	<u>SCSPSRASLL</u>	<u>TGLPQHONGM</u>	<u>YGLHQDVHHE</u>	
	<u>NSFDKVRSLP</u>	<u>LLLSQAGVRT</u>	<u>GIIGKKHVG P</u>	
	<u>ETVYPFDFAY</u>	<u>TEENGSVLQV</u>	<u>GRNITRIKLL</u>	
	<u>VRKFLQTQDD</u>	<u>RPFFLYVAFH</u>	<u>DPHRCGHSQP</u>	
	<u>QYGTFCFKFG</u>	<u>NGESGMGRIP</u>	<u>DWTPQAYDPL</u>	
	<u>DVLVPYFVPN</u>	<u>TPAARADLAA</u>	<u>QYTTVGRMDQ</u>	
	<u>GVGLVLQELR</u>	<u>DAGVLNDTLV</u>	<u>IFTSDN GIPF</u>	
	<u>PSGRTNLYWP</u>	<u>GTAEPLLVS S</u>	<u>PEHPKRWGQV</u>	
	<u>SEAYVSLLDL</u>	<u>TPTILDWFSI</u>	<u>PYPSYAIFGS</u>	
	<u>KTIHLTGRSL</u>			
	<u>LPALAEPLW</u>	<u>ATVFGSQSHH</u>	<u>EVTMSYPMRS</u>	
	<u>VQHRHFRLVH</u>	<u>NLNFKMPFPI</u>	<u>DQDFYVSPTF</u>	
	<u>QDLLNRTTAG</u>	<u>QPTGWYKDLR</u>	<u>HYYYRARWEL</u>	

	<u>YDRSRDPHET</u>	<u>QNLATDPRFA</u>	<u>QLLEMLRDQL</u>		
	<u>AKWQWETHDP</u>	<u>WVCAPDGVLE</u>	<u>EKLSPOCQPL</u>	<u>HNEL</u>	
151	APEAAGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	Клон CH3C.35.21.17 с мутациями типа «выступ» и LALA	
	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK		
	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK		
	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT		
	LPPSRDELTK	NQVSLWCLVK	GFYPSDIAVL		
	WESYGTEWSS	YKTPPVLDSDGS	FFLYSKL		
	TVTKEEWQQG	FVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS		LSLSPGK
152	<u>RPRNALLLLA</u>	<u>DDGGFESGAY</u>	<u>NNSAIATPHL</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc с последовательн остью зрелого SGSH человека (подчеркнута), слитой с N- концом последовательн ости Fc с мутациями типа «выступ» и LALA	
	<u>DALARRSLLF</u>	<u>RNAFTSVSSC</u>	<u>SPSRASLLTG</u>		
	<u>LPQHONGMYG</u>	<u>LHQDVHHFNS</u>	<u>FDKVRSLPLL</u>		
	<u>LSQAGVRTGI</u>	<u>IGKKHVGPE</u>	<u>VYPDFAYTE</u>		
	<u>ENGSVLQVGR</u>	<u>NITRIKLLVR</u>	<u>KFLQTQDDRP</u>		
	<u>FFLYVAFHDP</u>	<u>HRCGHSQPQY</u>	<u>GTFCEKFGNG</u>		
	<u>ESGMGRIPDW</u>	<u>TPQAYDPLDV</u>	<u>LVPYFVPNTP</u>		
	<u>AARADLAAQY</u>	<u>TTVGRMDQGV</u>	<u>GLVLQELRDA</u>		
	<u>GVLNDTLVIF</u>	<u>TSDNGIPFPS</u>	<u>GRTNLYWPGT</u>		<u>AEPLLVSSE</u>
	<u>HPKRWGVQVSE</u>	<u>AYVSLLDLTP</u>	<u>TILDWFSIPY</u>		
	<u>PSYAIFGSKT</u>	<u>IHLTGRSLLP</u>	<u>ALEAEPLWAT</u>		
	<u>VFGSQSHHEV</u>	<u>TMSYPMRSVQ</u>	<u>HRHFRLVHNL</u>		
	<u>NFKMPFPIDQ</u>	<u>DFYVSPTFQD</u>	<u>LLNRTTAGQP</u>		
	<u>TGWYKDLRHY</u>	<u>YYRARWELYD</u>	<u>RSRDPHETQN</u>		
	<u>LATDPRFAQL</u>	<u>LEMLRDQLAK</u>	<u>WQWETHDPWV</u>		
	<u>CAPDGVLEEK</u>	<u>LSPQCQPLHN</u>	<u>ELGGGGSDKT</u>		
	HTCPPCPAPE	AAGGPSVFLF	PPKPKDTLMI		
	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE		
	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW		
	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP		
	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLWCLVKGFY		
	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS		
	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH		
	NHYTQKSLSL	SPGK			
153	APEAAGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	Слитый полипептид	
	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK		

	<u>PREEQYNSTY</u>	<u>RVVSVLTVLH</u>	<u>QDWLNGKEYK</u>	SGSH-Fc с
	<u>CKVSNKALPA</u>	<u>PIEKTISKAK</u>	<u>GQPREPQVYT</u>	последовательн
	<u>LPPSRDELTK</u>	<u>NQVSLWCLVK</u>	<u>GFYPSDIAVE</u>	остью зрелого
	<u>WESNGQPENN</u>	<u>YKTPPVLDL</u>	<u>DGSFFLYSKL</u>	SGSH человека
	<u>TVDKSRWQQG</u>	<u>NVFSCSVMHE</u>	<u>ALHNHYTQKS</u>	(подчеркнута),
	<u>LSLSPGKGGG</u>	<u>GSRPRNALLL</u>	<u>LADDGGFESG</u>	слитой с С-
	<u>AYNNSAIATP</u>	<u>HLDALARRSL</u>	<u>LFRNAFTSVS</u>	концом
	<u>SCSPSRASLL</u>	<u>TGLPQHONGM</u>	<u>YGLHQDVHHE</u>	последовательн
	<u>NSFDKVRSLP</u>	<u>LLSQAGVRT</u>	<u>GIIGKKHVGPE</u>	ости Fc с
	<u>ETVYPFDFAI</u>	<u>TEENGSVLQV</u>	<u>GRNITRIKLL</u>	мутациями
	<u>VRKFLQTDQD</u>	<u>RPFFLYVAFH</u>	<u>DPHRCGHSQP</u>	типа «выступ»
	<u>QYGTFCFKFG</u>	<u>NGESGMGRIP</u>	<u>DWTPQAYDPL</u>	и LALA
	<u>DVLVPYFVFN</u>	<u>TPAARADLAA</u>	<u>QYTTVGRMDQ</u>	
	<u>GVGLVLQELR</u>	<u>DAGVLNDTLV</u>	<u>IFTSNNGIPF</u>	
	<u>PSGRTNLYWP</u>	<u>GTAPELLVSS</u>	<u>PEHPKRWGQV</u>	
	<u>SEAYVSLLDL</u>	<u>TPTILDWFSI</u>	<u>PYPSYAIFGS</u>	
	<u>KTIHLTGRSL</u>			
	<u>LPALAEPLW</u>	<u>ATVFGSQSHH</u>	<u>EVTMSYPMRS</u>	
	<u>VQHRHFRLVH</u>	<u>NLNFKMPFPI</u>	<u>DQDFYVSPTF</u>	
	<u>QDLLNRTTAG</u>	<u>OPTGWYKDLR</u>	<u>HYYYRARWEL</u>	
	<u>YDRSRDPHET</u>	<u>QNLATDPRFA</u>	<u>QLLEMLRDQL</u>	
	<u>AKWQWETHDP</u>	<u>WVCAPDGVLE</u>	<u>EKLSPQCQPL</u>	<u>HNEL</u>
154	<u>RPRNALLLLA</u>	<u>DDGGFESGAY</u>	<u>NNSAIATPHL</u>	Слитый
	<u>DALARRSLLF</u>	<u>RNAFTSVSSC</u>	<u>SPSRASLLTG</u>	полипептид
	<u>LPQHONGMYG</u>	<u>LHQDVHHEFNS</u>	<u>FDKVRSLPLL</u>	SGSH-Fc с
	<u>LSQAGVRTGI</u>	<u>IGKKHVGPEP</u>	<u>VYPFDFAYTE</u>	последовательн
	<u>ENGSVLQVGR</u>	<u>NITRIKLLVR</u>	<u>KFLQTDQDRP</u>	остью зрелого
	<u>FFLYVAFHDP</u>	<u>HRCGHSQPQY</u>	<u>GTFCEKFGNG</u>	SGSH человека
	<u>ESGMGRIPDW</u>	<u>TPQAYDPLDV</u>	<u>LVPYFVPNTP</u>	(подчеркнута),
	<u>AARADLAAQY</u>	<u>TTVGRMDQGV</u>	<u>GLVLQELRDA</u>	слитой с N-
	<u>GVLNDTLVIF</u>	<u>TSDNNGIPFPS</u>	<u>GRTNLYWPGT</u>	концом клона
	<u>HPKRWGQVSE</u>	<u>AYVSLLDLTP</u>	<u>TILDWFSIPY</u>	CH3C.35.21.17
	<u>PSYAIFGSKT</u>	<u>IHLTGRSLLP</u>	<u>ALEAEPLWAT</u>	с мутациями
	<u>VFGSQSHHEV</u>	<u>TMSYPMRSVQ</u>	<u>HRHFRLVHNL</u>	типа «выступ»
	<u>NFKMPFPIDQ</u>	<u>DFYVSPTFQD</u>	<u>LLNRTTAGQP</u>	и LALA
	<u>TGWYKDLRHY</u>	<u>YYRARWELYD</u>	<u>RSRDPHETQN</u>	

	<u>LATDPRFAQL</u> <u>LEMLRDQLAK</u> <u>WQWETHDPWV</u>	
	<u>CAPDGVLEEK</u> <u>LSPOCQPLHN</u> <u>ELGGGGSDKT</u>	
	HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI	
	SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE	
	VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW	
	LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP	
	REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLWCLVKGFY	
	PSDIAVLWES YGTEWSSYKT TPPVLDSGDS	
	FFLYSKLTVT KEEWQQGFVF SCSVMHEALH	
	NHYTQKSLSL SPGK	
155	APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT	Слитый полипептид SGSH-Fc с последовательн остью зрелого SGSH человека (подчеркнута), слитой с С- концом клона CH3C.35.21.17 с мутациями типа «выступ» и LALA
	CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK	
	PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK	
	CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT	
	LPPSRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVL	
	WESYGTEWSS YKTPPVLDS DGSFFLYSKL	
	TVTKEEWQQG FVFSCVMHE ALHNHYTQKS	
	LSLSPGKGGG GSRPRNALLL LADDGGFESG	
	<u>AYNNSAIATP</u> <u>HLDALARRSL</u> <u>LFRNAFTSVS</u>	
	<u>SCSPSRASLL</u> <u>TGLPQHONGM</u> <u>YGLHQDVHFF</u>	
	<u>NSFDKVRSLP</u> <u>LLSQAGVRT</u> <u>GIIGKKHVGP</u>	
	<u>ETVYPDFEAY</u> <u>TEENGSVLQV</u> <u>GRNITRIKLL</u>	
	<u>VRKFLQTQDD</u> <u>RPFFLYVAFH</u> <u>DPHRCGHSQP</u>	
	<u>QYGTFCFKFG</u> <u>NGESGMGRIP</u> <u>DWTPQAYDPL</u>	
	<u>DVLVPYFVFN</u> <u>TPAARADLAA</u> <u>QYTTVGRMDQ</u>	
	<u>GVGLVLQELR</u> <u>DAGVLNDTLV</u> <u>IFTSDNGIPF</u>	
	<u>PSGRTNLYWP</u> <u>GTAPELLVSS</u> <u>PEHPKRWGQV</u>	
	<u>SEAYVSLLDL</u> <u>TPTILDWFSI</u> <u>PYPSYAIFGS</u> <u>KTIHLTGRSL</u>	
	<u>LPALAEPLW</u> <u>ATVFGSQSHH</u> <u>EVTMSYPMRS</u>	
	<u>VQHRHFRLVH</u> <u>NLNFKMPFPI</u> <u>DQDFYVSPTF</u>	
	<u>QDLLNRRTAG</u> <u>OPTGWYKDLR</u> <u>HYYYRARWEL</u>	
	<u>YDRSRDPHET</u> <u>QNLATDPRFA</u> <u>QLLEMLRDQL</u>	
	<u>AKWQWETHDP</u> <u>WVCAPDGVLE</u> <u>EKLSPQCQPL</u> <u>HNEL</u>	
156	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	Клон CH3C.35.20.1 с

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	мутацией типа «выступ»
157	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «выступ» и LALA
158	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
159	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «выступ» и YTE
160	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
161	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGT EWSSYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «выступ», LALAPG и YTE
162	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED	Клон

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.35.20.1 мутациями типа «впадина»
163	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «впадина» и LALA
164	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
165	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «впадина» и YTE
166	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
167	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESFGTE WSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1 с мутациями типа «впадина», LALAPG и

		YTE
168	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутацией типа «выступ»</p>
169	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
170	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPG</p>
171	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и YTE</p>
172	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE</p>
173	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT</p>	<p>Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ»,</p>

	EWANYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	LALAPG и YTE
174	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 мутациями типа «впадина»
175	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA
176	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
177	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и YTE
178	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
179	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями

	VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	типа «впадина», LALAPG и YTE
180	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23.3 с мутацией типа «выступ»
181	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23.3 с мутациями типа «выступ» и LALA
182	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23.3 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
183	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23.3 с мутациями типа «выступ» и YTE
184	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
185	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED	Клон

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWNVNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALAPG и YTE
186	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 мутациями типа «впадина»
187	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 с мутациями типа «впадина» и LALA
188	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
189	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 с мутациями типа «впадина» и YTE
190	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE

191	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3 с мутациями типа «впадина», LALAPG и YTE
192	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутацией типа «выступ»
193	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ» и LALA
194	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
195	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ» и YTE
196	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFFYPSDIAVEWESYGT	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ»,

	EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	LALA и YTE
197	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ», LALAPG и YTE
198	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 мутациями типа «впадина»
199	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «впадина» и LALA
200	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
201	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «впадина» и YTE
202	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями

	VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	типа «впадина», LALA и YTE
203	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVSKEEWQQGFVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями типа «впадина», LALAPG и YTE
204	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутацией типа «выступ»
205	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ» и LALA
206	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
207	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ» и YTE
208	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED	Клон

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
209	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGT EWASYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ», LALAPG и YTE
210	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGT WASYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 мутациями типа «впадина»
211	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGT WASYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «впадина» и LALA
212	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGT WASYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
213	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGT WASYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «впадина» и YTE

214	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.21.17. 2 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
215	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTE WASYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.21.17. 2 с мутациями типа «впадина», LALAPG и YTE
216	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23 с мутацией типа «выступ»
217	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23 с мутациями типа «выступ» и LALA
218	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CHЗС.35.23 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
219	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT	Клон CHЗС.35.23 с мутациями типа «выступ»

	EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	и YTE
220	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «выступ», LALA и YTE
221	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «выступ», LALAPG и YTE
222	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 мутациями типа «впадина»
223	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «впадина» и LALA
224	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGT WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFC VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
225	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	Клон CH3C.35.23 с мутациями

	VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	типа «впадина» и YTE
226	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «впадина», LALA и YTE
227	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23 с мутациями типа «впадина», LALAPG и YTE
228	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFPYSDI AVLWESYGTIEWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEE WQQGFVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17. 2 с мутациями типа «выступ» и LALA и частью последовательн ости шарнирной области IgG1 человека
229	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFPYSDI AVEWESYGTIEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEE WQQGFVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA и частью последовательн ости

			шарнирной области IgG1 человека
230	SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYG DKLVRSFNID QLASHSLLFQ NAFAQQAVCA PSRVSFLTGR RPDTRRLYDF NSYWRVHAGN FSTIPQYFKE NGYVTMSVGK VFHPGISSNH TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD GELHANLLCP VDVLDVPEGT LPDKQSTEQA IQLLEKMKTS ASPFFLA VGY HKPHIPFRYP KEFQKLYPLE NITLAPDPEV PDGLPPVAYN PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVD FQRK IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG RTASLPEAGE KLFYLD PFD SASQLMEPGR QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRC PVP SFHVELCREG KNLLKHFRFR DLEEDPYLPG NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI DYRYTVWVGF NPDEF LANFS DIHAGELYFV DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMP		Последователь ность IDS
231	<u>SETQANSTTD</u> <u>ALNVLLIIVD</u> <u>DLRPSLGCYG</u> <u>DKLVRSFNID</u> <u>QLASHSLLFQ</u> <u>NAFAQQAVCA</u> <u>PSRVSFLTGR</u> <u>RPDTRRLYDF</u> <u>NSYWRVHAGN</u> <u>FSTIPQYFKE</u> <u>NGYVTMSVGK</u> <u>VFHPGISSNH</u> <u>TDDSPYSWSF</u> <u>PPYHPSSEKY</u> <u>ENTKTCRGPD</u> <u>GELHANLLCP</u> <u>VDVLDVPEGT</u> <u>LPDKQSTEQA</u> <u>IQLLEKMKTS</u> <u>ASPFFLA VGY</u> <u>HKPHIPFRYP</u> <u>KEFQKLYPLE</u> <u>NITLAPDPEV</u> <u>PDGLPPVAYN</u> <u>PWMDIRQRED</u> <u>VQALNISVPY</u> <u>GPIPVD FQRK</u> <u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u> <u>GWALGEHGEW</u> <u>AKYSNFDVAT</u> <u>HVPLIFYVPG</u> <u>RTASLPEAGE</u> <u>KLFYLD PFD</u> <u>SASQLMEPGR</u> <u>QSMDLVELVS</u> <u>LFPTLAGLAG</u> <u>LQVPPRC PVP</u> <u>SFHVELCREG</u> <u>KNLLKHFRFR</u> <u>DLEEDPYLPG</u>		Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS и мутациями типа «впадина» и LALA

	<u>NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</u> <u>DYRYTVWVGF NPDEFLANFS DIHAGELYFV</u> <u>DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMPGGGGS</u> DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	
232	<u>SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGICYG</u> <u>DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAVCA</u> <u>PSRVSFLTGR RPDTRRLYDF NSYWRVHAGN</u> <u>ESTIPQYFKE NGYVTMSVGK VFHPGISSNH</u> <u>TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD</u> <u>GELHANLLCP VDVLDVPEGT LPDKQSTEOA</u> <u>IQLLEKMKTS ASPFFLAVGY HKPHIPFRYP</u> <u>KEFQKLYPLE NITLAPDPEV PDGLPPVAYN</u> <u>PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDQFQRK</u> <u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u> <u>GWALGEHGEW AKYSNFDVAT HVPLIFYVPG</u> <u>RTASLPEAGE KLFPYLDPDF SASQLMEPGR</u> <u>QSMDLVELVS LFPTLAGLAG LQVPPRCVP</u> <u>SFHVELCREG KNLLKHFRFR DLEEDPYLPG</u> <u>NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</u> <u>DYRYTVWVGF NPDEFLANFS DIHAGELYFV</u> <u>DSDPLQDHNM YNDSQGGDLF QLLMPGGGGS</u> DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL	Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS и мутациями типа «впадина»

	TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	
233	<u>SETQANSTTD</u> <u>ALNVLLIIVD</u> <u>DLRPSLGCYG</u>	Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательн остью IDS и мутацией типа «выступ»
	<u>DKLVRSPNID</u> <u>QLASHSLLFQ</u> <u>NAFAQQAVCA</u>	
	<u>PSRVSFLTGR</u> <u>RPDTTRLYDF</u> <u>NSYWRVHAGN</u>	
	<u>FSTIPQYFKE</u> <u>NGYVTMSVGK</u> <u>VFHPGISSNH</u>	
	<u>TDDSPYSWSF</u> <u>PPYHPSSEKY</u> <u>ENTKTCRGPD</u>	
	<u>GELHANLLCP</u> <u>VDVLDVPEGT</u> <u>LPDKQSTEQA</u>	
	<u>IQLLEKMKTS</u> <u>ASPFFLAVGY</u> <u>HKPHIPFRYP</u>	
	<u>KEFQKLYPLE</u> <u>NITLAPDPEV</u> <u>PDGLPPVAYN</u>	
	<u>PWMDIRQRED</u> <u>VQALNISVPY</u> <u>GPIPVDFOQK</u>	
	<u>IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH</u>	
	<u>GWALGEHGEW</u> <u>AKYSNFDVAT</u> <u>HVPLIFYVPG</u>	
	<u>RTASLPEAGE</u> <u>KLFPYLDPDF</u> <u>SASQLMEPGR</u>	
	<u>QSMDLVELVS</u> <u>LFPTLAGLAG</u> <u>LQVPPRCVPV</u>	
	<u>SFHVELCREG</u> <u>KNLLKHFRFR</u> <u>DLEEDPYLPG</u>	
	<u>NPRELIAYSQ YPRPSDIPQW NSDKPSLKDI KIMGYSIRTI</u>	
	<u>DYRYTVWVGF</u> <u>NPDEFLANFS</u> <u>DIHAGELYFV</u>	
	<u>DSDPLQDHNM</u> <u>YNDSQGGDLF</u> <u>QLLMPGGGGS</u>	
	<u>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT</u>	
	<u>CVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTK</u>	
	<u>PREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYK</u>	
<u>CKVSNKALPA</u> <u>PIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYT</u>		
<u>LPPSRDELTK</u> <u>NQVSLWCLVK</u> <u>GFYPSDIAVE</u>		
<u>WESNGQPENN</u> <u>YKTTTPVLDS</u> <u>DGSFFLYSKL</u>		
TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK		
234	SETQANSTTD ALNVLLIIVD DLRPSLGCYG	Последователь ность IDS (остаток формилглицин а «fG» дважды подчеркнут)
	DKLVRSPNID QLASHSLLFQ NAFAQQAV <u>fGA</u>	
	PSRVSFLTGR RPDTRLYDF NSYWRVHAGN	
	FSTIPQYFKE NGYVTMSVGK VFHPGISSNH	
	TDDSPYSWSF PPYHPSSEKY ENTKTCRGPD	
	GELHANLLCP VDVLDVPEGT LPDKQSTEQA	
	IQLLEKMKTS ASPFFLAVGY HKPHIPFRYP	
	KEFQKLYPLE NITLAPDPEV PDGLPPVAYN	
	PWMDIRQRED VQALNISVPY GPIPVDFOQK	
	IRQSYFASVS YLDTQVGRLL SALDDLQLAN STIIAFTSDH	

	GWALGEGHEW	AKYSNFDVAT	HVPLIFYVPG	
	RTASLPEAGE	KLFPYLDPFD	SASQLMEPGR	
	QSMDLVELVS	LFPTLAGLAG	LQVPPRCVP	
	SFHVELCREG	KNLLKHFRFR	DLEEDPYLPG	
	NPRESLIAYSQ	YPRPSDIPQW	NSDKPSLKDI	KIMGYSIRTI
	DYRYTVWVGF	NPDEFLANFS	DIHAGELYFV	
	DSDPLQDHNM	YNDSQGGDLF	QLLMP	
	<u>SETQANSTTD</u>	<u>ALNVLLIIVD</u>	<u>DLRPSLG CYG</u>	
	<u>DKLVRSPNID</u>	<u>QLASHSLLFQ</u>	<u>NAFAQQAVfGA</u>	
	<u>PSRVSFLTGR</u>	<u>RPDTTRLYDF</u>	<u>NSYWRVHAGN</u>	
	<u>FSTIPQYFKE</u>	<u>NGYVTMSVGK</u>	<u>VFHPGISSNH</u>	
	<u>TDDSPYSWSF</u>	<u>PPYHPSSEKY</u>	<u>ENTKTCRGPD</u>	
	<u>GELHANLLCP</u>	<u>VDVLDVPEGT</u>	<u>LPDKQSTEQA</u>	
	<u>IQLLEKMKTS</u>	<u>ASPFFLAVGY</u>	<u>HKPHIPFRYP</u>	
	<u>KEFQKLYPLE</u>	<u>NITLAPDPEV</u>	<u>PDGLPPVAYN</u>	
	<u>PWMDIRORED</u>	<u>VQALNISVPY</u>	<u>GPIPVDFOQK</u>	
	<u>IRQSYFASVS</u>	<u>YLDTQVGRLL</u>	<u>SALDDLQLAN</u>	<u>STIIAFTSDH</u>
	<u>GWALGEGHEW</u>	<u>AKYSNFDVAT</u>	<u>HVPLIFYVPG</u>	
	<u>RTASLPEAGE</u>	<u>KLFPYLDPFD</u>	<u>SASQLMEPGR</u>	
235	<u>QSMDLVELVS</u>	<u>LFPTLAGLAG</u>	<u>LQVPPRCVP</u>	
	<u>SFHVELCREG</u>	<u>KNLLKHFRFR</u>	<u>DLEEDPYLPG</u>	
	<u>NPRESLIAYSQ</u>	<u>YPRPSDIPQW</u>	<u>NSDKPSLKDI</u>	<u>KIMGYSIRTI</u>
	<u>DYRYTVWVGF</u>	<u>NPDEFLANFS</u>	<u>DIHAGELYFV</u>	
	<u>DSDPLQDHNM</u>	<u>YNDSQGGDLF</u>	<u>QLLMPGGGGS</u>	
	<u>DKTHTCPPCP</u>	<u>APEAAGGPSV</u>	<u>FLFPPKPKDT</u>	
	<u>LMISRTPEVT</u>	<u>CVVVDVSHED</u>	<u>PEVKFNWYVD</u>	
	<u>GVEVHNAKTK</u>	<u>PREEQYNSTY</u>	<u>RVVSVLTVLH</u>	
	<u>QDWLNGKEYK</u>	<u>CKVSNKALPA</u>	<u>PIEKTISKAK</u>	
	<u>GQPREPQVYT</u>	<u>LPPSRDELTK</u>	<u>NQVSLSCAVK</u>	
	<u>GFYPSDIAVE</u>	<u>WESNGQPENN</u>	<u>YKTTTPVLDS</u>	
	<u>DGSFFLVSKL</u>	<u>TVDKSRWQQG</u>	<u>NVFSCSVMHE</u>	
	<u>ALHNHYTQKS</u>	<u>LSLSPGK</u>		
236	<u>SETQANSTTD</u>	<u>ALNVLLIIVD</u>	<u>DLRPSLG CYG</u>	Слитый
	<u>DKLVRSPNID</u>	<u>QLASHSLLFQ</u>	<u>NAFAQQAVfGA</u>	полипептид

Слитый
полипептид
IDS-Fc с
подчеркнутой
последовательностью
IDS
(остаток
формилглицина
а «fG» дважды
подчеркнут) и
мутациями
типа «впадина»
и LALA

	<u>PSRVSFLTGR</u>	<u>RPDTTRLYDF</u>	<u>NSYWRVHAGN</u>	IDS-Fc с подчеркнутой последовательностью IDS (остаток формилглицина «fG» дважды подчеркнут) и мутациями типа «впадина»	
	<u>FSTIPQYFKE</u>	<u>NGYVTMSVGK</u>	<u>VFHPGISSNH</u>		
	<u>TDDSPYSWSF</u>	<u>PPYHPSSEKY</u>	<u>ENTKTCRGPD</u>		
	<u>GELHANLLCP</u>	<u>VDVLDVPEGT</u>	<u>LPDKQSTEQA</u>		
	<u>IQLLEKMKTS</u>	<u>ASPFFLAVGY</u>	<u>HKPHIPFRYP</u>		
	<u>KEFQKLYPLE</u>	<u>NITLAPDPEV</u>	<u>PDGLPPVAYN</u>		
	<u>PWMDIRQRED</u>	<u>VQALNISVPY</u>	<u>GPIPVDFOQK</u>		
	<u>IRQSYFASVS</u>	<u>YLDTQVGRLL</u>	<u>SALDDLQLAN</u>		<u>STIIAFTSDH</u>
	<u>GWALGEGHEW</u>	<u>AKYSNFDVAT</u>	<u>HVPLIFYVPG</u>		
	<u>RTASLPEAGE</u>	<u>KLFPYLDPDF</u>	<u>SASQLMEPGR</u>		
	<u>QSMDLVELVS</u>	<u>LFPTLAGLAG</u>	<u>LQVPPRCVP</u>		
	<u>SFHVELCREG</u>	<u>KNLLKHFRFR</u>	<u>DLEEDPYLPG</u>		
	<u>NPRELIAYSQ</u>	<u>YPRPSDIPQW</u>	<u>NSDKPSLKDI</u>		<u>KIMGYSIRTI</u>
	<u>DYRYTVWVGF</u>	<u>NPDEFANFS</u>	<u>DIHAGELYFV</u>		
	<u>DSDPLQDHNM</u>	<u>YNDSQGGDLF</u>	<u>QLLMPGGGGS</u>		
	<u>DKTHTCPPCP</u>	<u>APELLGGPSV</u>	<u>FLFPPKPKDT</u>		<u>LMISRTPEVT</u>
	<u>CVVVDVSHED</u>	<u>PEVKFNWYVD</u>	<u>GVEVHNAKTK</u>		
	<u>PREEQYNSTY</u>	<u>RVVSVLTVLH</u>	<u>QDWLNGKEYK</u>		
	<u>CKVSNKALPA</u>	<u>PIEKTISKAK</u>	<u>GQPREPQVYT</u>		
	<u>LPPSRDELTK</u>	<u>NQVSLSCAVK</u>	<u>GFYPSDIAVE</u>		
	<u>WESNGQPENN</u>	<u>YKTTTPVLDS</u>	<u>DGSFFLVSKL</u>		
	<u>TVDKSRWQQG</u>	<u>NVFSCSVMHE</u>	<u>ALHNHYTQKS</u>	<u>LSLSPGK</u>	
237	<u>SETQANSTTD</u>	<u>ALNVLLIIVD</u>	<u>DLRPSLG CYG</u>	Слитый полипептид IDS-Fc с подчеркнутой последовательностью IDS (остаток формилглицина «fG» дважды подчеркнут) и мутациями типа «выступ»	
	<u>DKLVRSPNID</u>	<u>QLASHSLLFQ</u>	<u>NAFAQQAVfGA</u>		
	<u>PSRVSFLTGR</u>	<u>RPDTTRLYDF</u>	<u>NSYWRVHAGN</u>		
	<u>FSTIPQYFKE</u>	<u>NGYVTMSVGK</u>	<u>VFHPGISSNH</u>		
	<u>TDDSPYSWSF</u>	<u>PPYHPSSEKY</u>	<u>ENTKTCRGPD</u>		
	<u>GELHANLLCP</u>	<u>VDVLDVPEGT</u>	<u>LPDKQSTEQA</u>		
	<u>IQLLEKMKTS</u>	<u>ASPFFLAVGY</u>	<u>HKPHIPFRYP</u>		
	<u>KEFQKLYPLE</u>	<u>NITLAPDPEV</u>	<u>PDGLPPVAYN</u>		
	<u>PWMDIRQRED</u>	<u>VQALNISVPY</u>	<u>GPIPVDFOQK</u>		
	<u>IRQSYFASVS</u>	<u>YLDTQVGRLL</u>	<u>SALDDLQLAN</u>		<u>STIIAFTSDH</u>
	<u>GWALGEGHEW</u>	<u>AKYSNFDVAT</u>	<u>HVPLIFYVPG</u>		
	<u>RTASLPEAGE</u>	<u>KLFPYLDPDF</u>	<u>SASQLMEPGR</u>		
	<u>QSMDLVELVS</u>	<u>LFPTLAGLAG</u>	<u>LQVPPRCVP</u>		

	<u>SFHVELCREG</u> <u>KNLLKHFRFR</u> <u>DLEEDPYLPG</u> <u>NPRELIAYSQ</u> <u>YPRPSDIPQW</u> <u>NSDKPSLKDI</u> <u>KIMGYSIRTI</u> <u>DYRYTVWVGF</u> <u>NPDEFLANFS</u> <u>DIHAGELYFV</u> <u>DSDPLQDHNM</u> <u>YNDSQGGDLF</u> <u>QLLMPGGGGS</u> DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	
238	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHA NFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLN AIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSF NHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSD WKTDSTCRMVTSESKNVCLTVS	Апикальный домен TfR человека
239	GGGGS	Глицин- богатый линкер
240	GGGGSGGGGS	Глицин- богатый линкер
241	НННННН	Гексагистидин овый тэг
242	YxTEWSS	Библиотечный мотив

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:

(a) первый Fc-полипептид, слитый с ферментом для ферментной заместительной терапии (ERT), вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом; и

(b) второй Fc-полипептид, который образует Fc-димер с первым Fc-полипептидом, причем первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид не содержат последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части.

2. Белок по п.1, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS), вариант IDS или ее каталитически активный фрагмент.

3. Белок по п.2, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234.

4. Белок по п.3, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:91, 92, 114, 230 и 234.

5. Белок по п.1, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), вариант SGSH или ее каталитически активный фрагмент.

6. Белок по п.5, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 119 и 120.

7. Белок по п.6, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 119 и 120.

8. Белок по п.1, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой кислую сфингомиелиназу (ASM), вариант ASM или ее каталитически активный фрагмент.

9. Белок по п.8, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 121, 122 и 123.

10. Белок по п.9, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 121, 122 и 123.

11. Белок по п.1, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой кислую β -глюкоцереброзидазу (GBA), вариант GBA или ее каталитически активный фрагмент.

12. Белок по п.11, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:93 и 94.

13. Белок по п.12, отличающийся тем, что ERT-фермент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:93 и 94.

14. Белок по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или

полипептидным линкером.

15. Белок по п.14, отличающийся тем, что полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер.

16. Белок по п.15, отличающийся тем, что полипептидный линкер представляет собой богатый глицином линкер.

17. Белок по п.16, отличающийся тем, что богатый глицином линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:239) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:240).

18. Белок по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что второй Fc-полипептид связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом.

19. Белок по п.18, отличающийся тем, что второй Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером.

20. Белок по п.18 или 19, отличающийся тем, что N-конец первого Fc-полипептида и/или N-конец второго Fc-полипептида связаны с ERT-ферментом.

21. Белок по п.20, отличающийся тем, что N-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а N-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

22. Белок по п.18 или 19, отличающийся тем, что C-конец первого Fc-полипептида и/или C-конец второго Fc-полипептида связаны с ERT-ферментом.

23. Белок по п.22, отличающийся тем, что C-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а C-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

24. Белок по п.18 или 19, отличающийся тем, что N-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а C-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

25. Белок по п.18 или 19, отличающийся тем, что C-конец первого Fc-полипептида связан с одним ERT-ферментом, а N-конец второго Fc-полипептида связан с другим ERT-ферментом.

26. Белок по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что указанный белок содержит один ERT-фермент, а N-конец или C-конец первого Fc-полипептида связан с указанным ERT-ферментом.

27. Белок по любому из пп.18-25, отличающийся тем, что указанный белок содержит два ERT-фермента.

28. Белок по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что слитый полипептид содержит, от N- к C-концу: ERT-фермент, вариант ERT-фермента или его каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и первый Fc-полипептид.

29. Белок по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид

представляет собой модифицированный Fc-полипептид.

30. Белок по п.29, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид, каждый, содержат модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

31. Белок по п.30, отличающийся тем, что Fc-димер представляет собой Fc-гетеродимер.

32. Белок по п.30 или 31, отличающийся тем, что один из Fc-полипептидов содержит замену T366W, а другой Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

33. Белок по п.32, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй Fc-полипептид содержит замену T366W.

34. Белок по п.33, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 117, 232 и 236.

35. Белок по п.32, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид содержит замену T366W, а второй Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V.

36. Белок по п.35, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 118, 233 и 237.

37. Белок по любому из пп.29-36, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат нативный сайт связывания FcRn.

38. Белок по любому из пп.29-37, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид не имеют эффекторной функции.

39. Белок по любому из пп.29-37, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат модификацию, которая снижает эффекторную функцию.

40. Белок по п.39, отличающийся тем, что модификация, которая снижает эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в позиции 234 и Ala в позиции 235 в соответствии с нумерацией EU.

41. Белок по п.40, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 115, 231 и 235.

42. Белок по п.40, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид связан с ERT-ферментом и содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 149, 150, 152 и 153.

43. Белок по любому из пп.29-42, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотные изменения относительно нативной Fc-последовательности, которые продлевают сывороточное время полужизни.

44. Белок по п.43, отличающийся тем, что аминокислотные изменения включают замены Tug в позиции 252, Thr в позиции 254 и Glu в позиции 256 в соответствии с нумерацией EU.

45. Белок по п.43, отличающийся тем, что аминокислотные изменения включают замены Leu в позиции 428 и Ser в позиции 434 в соответствии с нумерацией EU.

46. Белок по п.43, отличающийся тем, что аминокислотные изменения включают замену Ser или Ala в позиции 434 в соответствии с нумерацией EU.

47. Белок по любому из пп.29-46, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид специфически связываются с трансферриновым рецептором (TfR).

48. Белок по п.47, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат, по меньшей мере, две замены в позициях, выбранных из группы, состоящей из 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии с нумерацией EU.

49. Белок по п.48, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат, по меньшей мере, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в указанных позициях.

50. Белок по п.48 или 49, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержат одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 380, 391, 392 и 415 в соответствии с нумерацией EU.

51. Белок по любому из пп.48-50, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержат одну, две или три замены в позициях, включающих 414, 424 и 426 в соответствии с нумерацией EU.

52. Белок по любому из пп.48-51, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат Trp в позиции 388.

53. Белок по любому из пп.48-52, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат ароматическую аминокислоту в позиции 421.

54. Белок по п.53, отличающийся тем, что ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe.

55. Белок по любому из пп.48-54, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат, по меньшей мере, одну позицию, выбранную из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

56. Белок по п.55, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 позиций, выбранных из следующего: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой

Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

57. Белок по п.56, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат 11 позиций следующим образом: позиция 380 представляет собой Trp, Leu или Glu; позиция 384 представляет собой Tyr или Phe; позиция 386 представляет собой Thr; позиция 387 представляет собой Glu; позиция 388 представляет собой Trp; позиция 389 представляет собой Ser, Ala, Val или Asn; позиция 390 представляет собой Ser или Asn; позиция 413 представляет собой Thr или Ser; позиция 415 представляет собой Glu или Ser; позиция 416 представляет собой Glu; и позиция 421 представляет собой Phe.

58. Белок по п.56 или 57, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат СН3-домен с, по меньшей мере, 85% идентичности, по меньшей мере, 90% идентичности или, по меньшей мере, 95% идентичности с аминокислотами 111-217 любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229.

59. Белок по п.58, отличающийся тем, что остатки в, по меньшей мере, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 позициях, соответствующих позициям по нумерации EU 380, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 413, 414, 415, 416, 421, 424 и 426, любой из SEQ ID NO:34-38, 58 и 60-90, 151 и 156-229 не удалены или не замещены.

60. Белок по п.58 или 59, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 156-229.

61. Белок по п.60, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 157, 169, 181, 193, 205 и 217.

62. Белок по п.60, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 115, 231 и 235, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:205 и 228.

63. Белок по п.60, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 115, 231 и 235, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 169 и 229.

64. Белок по любому из пп.47-63, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид связываются с апикальным доменом TfR.

65. Белок по любому из пп.47-64, отличающийся тем, что связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

66. Белок по любому из пп.47-65, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид имеют идентичность аминокислотной последовательности, составляющую, по меньшей мере, 75% или, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 92% или 95% по сравнению с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа.

67. Белок по п.66, отличающийся тем, что соответствующий Fc-полипептид дикого типа представляет собой Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

68. Белок по любому из пп.47-67, отличающийся тем, что поглощение ERT-фермента в головном мозге, по меньшей мере, в десять раз больше по сравнению с поглощением ERT-фермента в отсутствие первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида или по сравнению с поглощением ERT-фермента без модификаций первого Fc-полипептида и/или второго Fc-полипептида, которые приводят к связыванию TfR.

69. Белок по любому из пп.1-68, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид не модифицирован для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а второй Fc-полипептид модифицирован для специфического связывания TfR.

70. Белок по любому из пп.1-68, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид модифицирован для специфического связывания TfR, а второй Fc-полипептид не модифицирован для связывания с рецептором ГЭБ.

71. Белок по любому из пп.1-70, отличающийся тем, что белок не содержит последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающей части.

72. Полипептид, содержащий Fc-полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом, причем Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом.

73. Полипептид по п.72, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу (IDS), вариант IDS или ее каталитически активный фрагмент.

74. Полипептид по п.72, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу (SGSH), вариант SGSH или ее каталитически активный фрагмент.

75. Полипептид по п.72, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой кислую сфингомиелиназу (ASM), вариант ASM или ее каталитически активный фрагмент.

76. Полипептид по п.72, отличающийся тем, что ERT-фермент представляет собой кислую β -глюкоцереброзидазу (GBA), вариант GBA или ее каталитически активный фрагмент.

77. Полипептид по любому из пп.72-76, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид представляет собой слитый полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером.

78. Полипептид по п.77, отличающийся тем, что слитый полипептид содержит, от N- к C-концу: ERT-фермент, вариант ERT-фермента или его каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и первый Fc-полипептид.

79. Полипептид по любому из пп.72-78, отличающийся тем, что Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

80. Полипептид по п.79, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 115, 117, 231, 232, 235 и 236.

81. Полипептид по п.79, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 149 и 150.

82. Полипептид по любому из пп.72-78, отличающийся тем, что Fc-полипептид содержит замену T366W.

83. Полипептид по п.82, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 118, 233 и 237.

84. Полипептид по п.82, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 152-155.

85. Полипептид по любому из пп.72-84, отличающийся тем, что указанный полипептид дополнительно содержит другой Fc-полипептид.

86. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по любому из пп.72-84.

87. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.86.

88. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.86 или вектор по п.87.

89. Клетка-хозяин по п.88, дополнительно содержащая полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую другой Fc-полипептид.

90. Способ получения полипептида, содержащего Fc-полипептид, который связан с ERT-ферментом, вариантом ERT-фермента или его каталитически активным фрагментом, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый полинуклеотидом по п.86.

91. Способ лечения лизосомной болезни накопления (LSD), включающий введение белка по любому из пп.1-71 или полипептида по любому из пп.72-85 нуждающемуся в этом пациенту.

92. Способ снижения накопления токсических продуктов метаболизма у пациента, имеющего LSD, включающий введение белка по любому из пп.1-71 или полипептида по любому из пп.72-85 пациенту.

93. Способ по п.91 или 92, отличающийся тем, что LSD представляет собой синдром Хантера, а ERT-фермент представляет собой IDS.

94. Способ по п.93, отличающийся тем, что токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата дисахариды и/или полученные из дерматансульфата дисахариды.

95. Способ по п.91 или 92, отличающийся тем, что LSD представляет собой синдром Санфилиппо А, а ERT-фермент представляет собой SGSH.

96. Способ по п.95, отличающийся тем, что токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата олигосахариды.

97. Способ по п.91 или 92, отличающийся тем, что LSD представляет собой болезнь Ниманна - Пика, а ERT-фермент представляет собой ASM.

98. Способ по п.97, отличающийся тем, что токсичный продукт метаболизма включает сфингомиелин.

99. Способ по п.91 или 92, отличающийся тем, что LSD представляет собой

болезнь Гоше или болезнь Паркинсона, а ERT-фермент представляет собой GBA.

100. Способ по п.99, отличающийся тем, что токсичный продукт метаболизма включает глюкозилцерамид.

101. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1-71 или полипептид по любому из пп.72-85 и фармацевтически приемлемый носитель.

102. Способ отслеживания накопления субстрата для оценки активности IDS, включающий:

(а) разрушение клеток в клеточном или тканевом образце от субъекта, которому вводят белок по любому из пп.2-4, 14-41 и 43-71 или полипептид по любому из пп.72-73, 77-80, 82-83 и 85, для того, чтобы вскрыть микровезикулы для получения подлежащего анализу раствора гликозаминогликана (GAG);

(b) расщепление раствора GAG, по меньшей мере, одной гепариназой и хондроитиназой B, чтобы получить полученные из GAG дисахариды;

(с) анализ полученных из GAG дисахаридов методом масс-спектрометрии; и

(d) определение уровней полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов, причем снижение уровней полученных из гепарансульфата и/или дерматансульфата дисахаридов по сравнению с контролем с отсутствием активности IDS указывает на повышение активности IDS в образце по сравнению с контролем.

103. Способ по п.102, отличающийся тем, что этап разрушения клеток включает, по меньшей мере, один цикл замораживания-размораживания и, по меньшей мере, один этап обработки ультразвуком.

104. Способ по п.103, отличающийся тем, что клетки получены из тканевого образца, а способ включает, по меньшей мере, три, четыре или пять циклов замораживания-размораживания.

105. Способ по любому из пп.102-104, отличающийся тем, что субъект представляет собой мышь с дефицитом активности IDS.

106. Способ по любому из пп.102-104, отличающийся тем, что субъект представляет собой отличного от человека примата.

107. Способ по любому из пп.102-104, отличающийся тем, что субъект представляет собой пациента-человека, имеющего синдром Хантера.

108. Способ отслеживания накопления субстрата для оценки активности SGSH, включающий:

(а) разрушение клеток в клеточном или тканевом образце от субъекта, которому вводят белок по любому из пп.5-7, 14-33, 35, 37-40 и 42-71 или полипептид по любому из пп.72, 74, 77-79, 81-82 и 84-85, для того, чтобы вскрыть микровезикулы для получения подлежащего анализу раствора гликозаминогликана (GAG);

(b) расщепление раствора GAG, по меньшей мере, одной гепариназой, чтобы получить полученные из GAG дисахариды;

(с) анализ полученных из GAG дисахаридов методом масс-спектрометрии; и

(d) определение уровней полученных из гепарансульфата дисахаридов, причем

снижение уровней полученных из гепарансульфата дисахаридов по сравнению с контролем с отсутствием активности SGSH указывает на повышение активности SGSH в образце по сравнению с контролем.

109. Способ по п.108, отличающийся тем, что этап разрушения клеток включает, по меньшей мере, один цикл замораживания-размораживания и, по меньшей мере, один этап обработки ультразвуком.

110. Способ по п.109, отличающийся тем, что клетки получены из тканевого образца, а способ включает, по меньшей мере, три, четыре или пять циклов замораживания-размораживания.

111. Способ по любому из пп.108-110, отличающийся тем, что субъект представляет собой мышь с дефицитом активности SGSH.

112. Способ по любому из пп.108-110, отличающийся тем, что субъект представляет собой отличного от человека примата.

113. Способ по любому из пп.108-110, отличающийся тем, что субъект представляет собой пациента-человека, имеющего синдром Санфилиппо А.

114. Способ переноса агента через ГЭБ млекопитающего, включающий взаимодействие с ГЭБ белка, который связывается с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ, причем белок связан с агентом и переносит связанный агент через ГЭБ.

115. Способ по п.114, отличающийся тем, что повышается максимальная концентрация ($C_{\text{макс}}$) агента в головном мозге млекопитающего.

116. Способ по п.114 или 115, отличающийся тем, что агент применим при лечении LSD.

117. Способ лечения LSD, включающий введение млекопитающему белка, который связывается с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 250 нМ, причем белок связан с агентом для лечения LSD, таким образом, обеспечивая воздействие агента на головной мозг млекопитающего.

118. Способ по любому из пп.114-117, отличающийся тем, что указанный белок повышает $C_{\text{макс}}$ агента в головном мозге по сравнению с агентом, связанным с референсным белком, который связывается с TfR с меньшей аффинностью.

119. Способ по любому из пп.114-118, отличающийся тем, что указанный белок повышает $C_{\text{макс}}$ агента в терапевтически эффективной концентрации у млекопитающего по сравнению с агентом, связанным с референсным белком, который связывается с TfR с меньшей аффинностью.

120. Способ по любому из пп.118-119, отличающийся тем, что референсный белок связывается с TfR с аффинностью около 600 нМ или меньше.

121. Способ по любому из пп.114-120, отличающийся тем, что TfR представляет собой TfR примата.

122. Способ по п.121, отличающийся тем, что TfR примата представляет собой TfR человека.

123. Способ по любому из пп.114-122, отличающийся тем, что указанный белок

связывается с апикальным доменом TfR.

124. Способ по любому из пп.114-123, отличающийся тем, что указанный белок связывается с TfR с аффинностью от около 100 нМ до около 200 нМ.

125. Способ по любому из пп.114-124, отличающийся тем, что указанный белок связывается с TfR с аффинностью от около 110 нМ до около 150 нМ.

126. Способ по любому из пп.119-125, отличающийся тем, что терапевтически эффективная концентрация агента представляет собой концентрацию, которая позволяет лечить один или более симптомов LSD у млекопитающего.

127. Способ по любому из пп.114-126, отличающийся тем, что агент представляет собой белковое заместительное терапевтическое средство.

128. Способ по любому из пп.114-127, отличающийся тем, что указанные агент или белковое заместительное терапевтическое средство представляют собой фермент.

129. Способ по п.128, отличающийся тем, что указанный фермент снижает накопление токсических продуктов метаболизма в головном мозге млекопитающего, имеющего LSD, в большей степени, когда он связан с белком, по сравнению со случаем, когда фермент связан с референсным белком.

130. Способ по п.128 или 129, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой IDS, а LSD представляет собой синдром Хантера.

131. Способ по п.130, отличающийся тем, что токсичный продукт метаболизма включает полученные из гепарансульфата дисахариды и/или полученные из дерматансульфата дисахариды.

132. Способ по п.128 или 129, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой SGSH, а LSD представляет собой синдром Санфилиппо А.

133. Способ по п.128 или 129, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой ASM, а LSD представляет собой болезнь Ниманна-Пика.

134. Способ по п.128 или 129, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой GBA, а LSD представляет собой болезнь Гоше.

135. Способ по любому из пп.114-126, отличающийся тем, что указанный агент содержит вариабельную область антитела.

136. Способ по п.135, отличающийся тем, что указанный агент содержит фрагмент антитела.

137. Способ по п.136, отличающийся тем, что указанный агент содержит Fab или scFv.

138. Способ по любому из пп.114-137, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который содержит ненативный сайт связывания, способный связывать TfR.

139. Способ по любому из пп.114-137, отличающийся тем, что указанный белок содержит вариабельную область антитела, которая специфически связывает TfR.

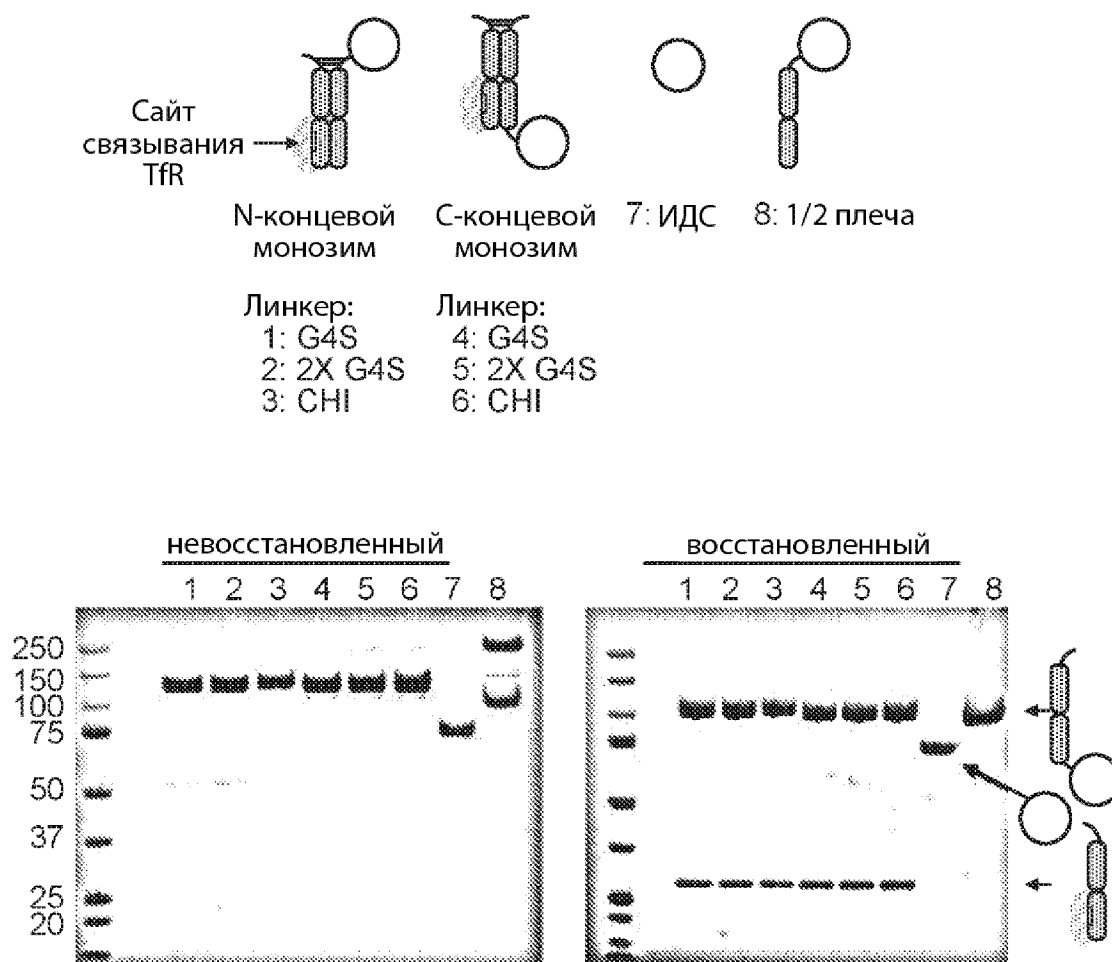
140. Способ по п.139, отличающийся тем, что указанный белок содержит фрагмент антитела.

141. Способ по п.140, отличающийся тем, что указанный белок содержит Fab или scFv.

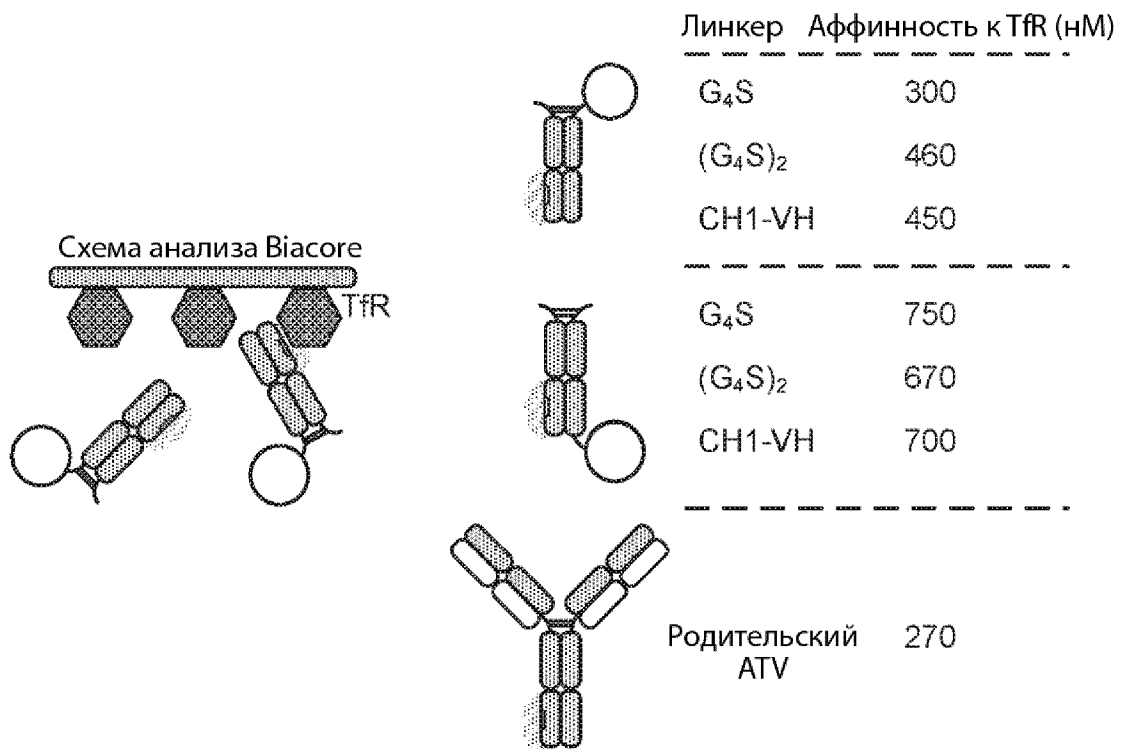
142. Способ по любому из пп.114-141, отличающийся тем, что указанный белок, связанный с указанным агентом, вводят как часть фармацевтически приемлемого носителя.

По доверенности

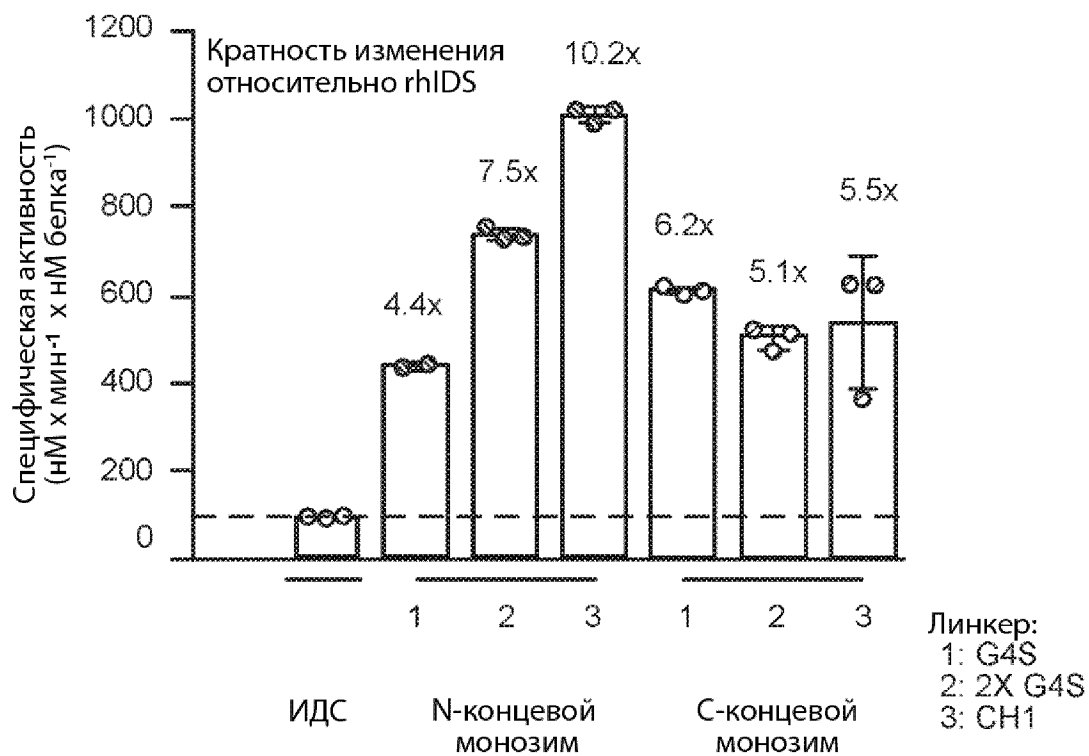
1/26



Фиг. 1

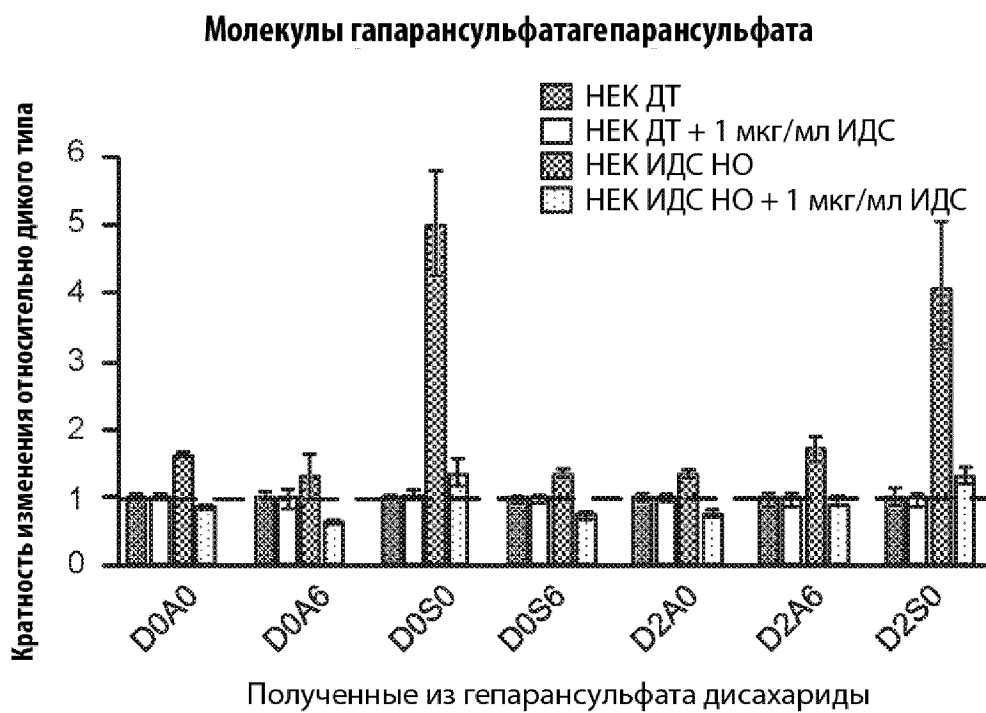


Фиг. 2



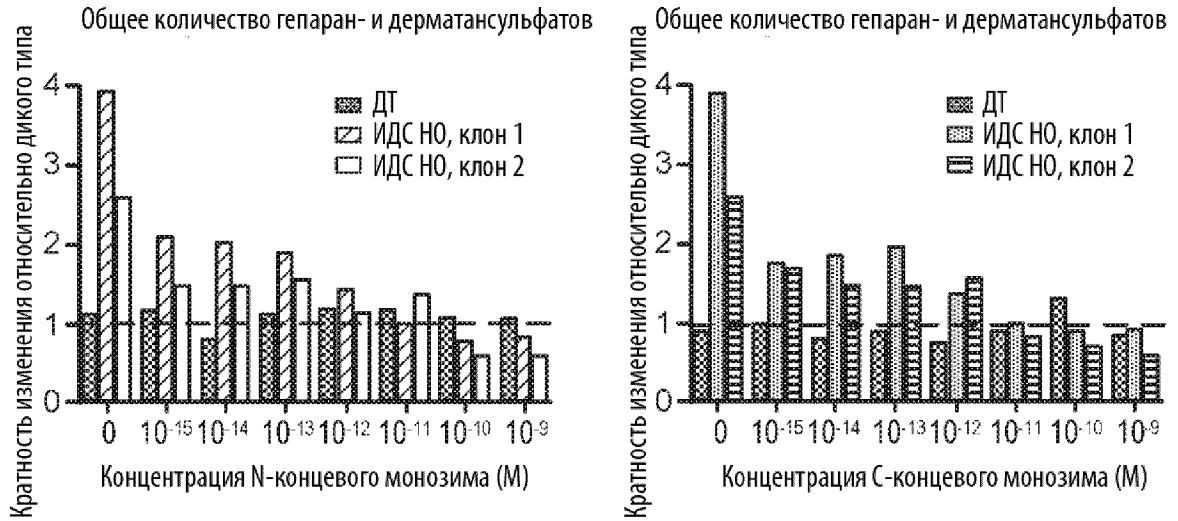
Технические повторы $n = 3$, данные приведены как среднее \pm CO

Фиг. 3

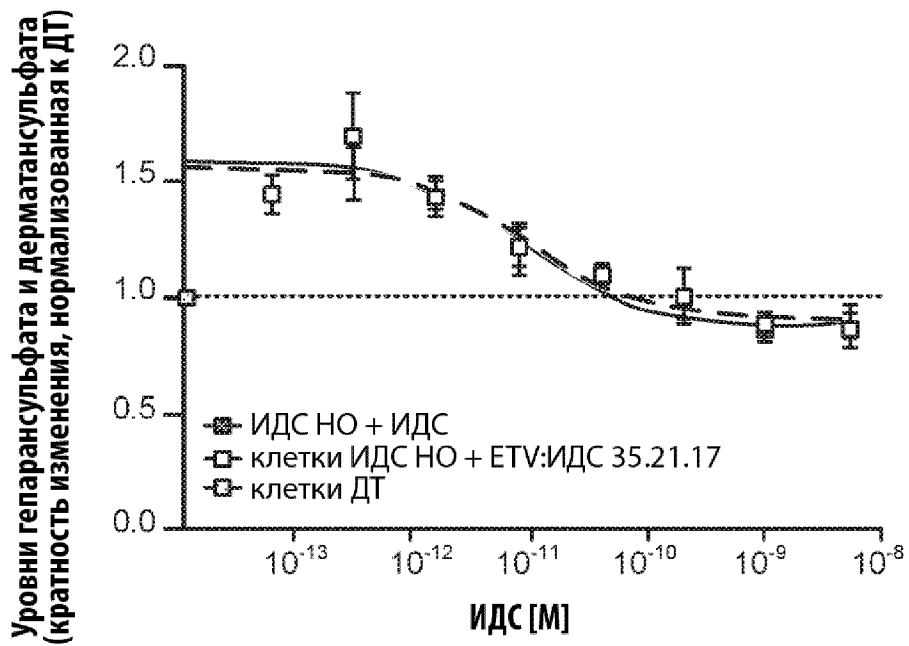


Данные приведены как среднее и СПС по трем линиям клеток ИДС НО

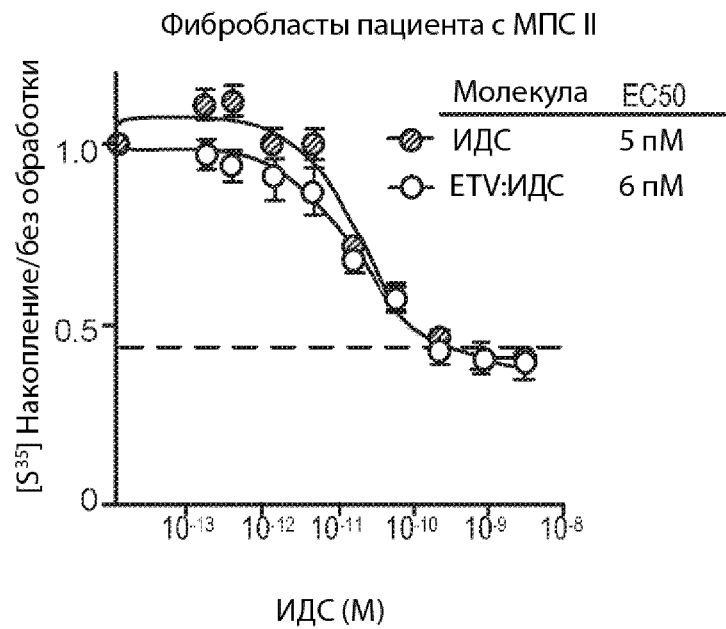
Фиг. 4



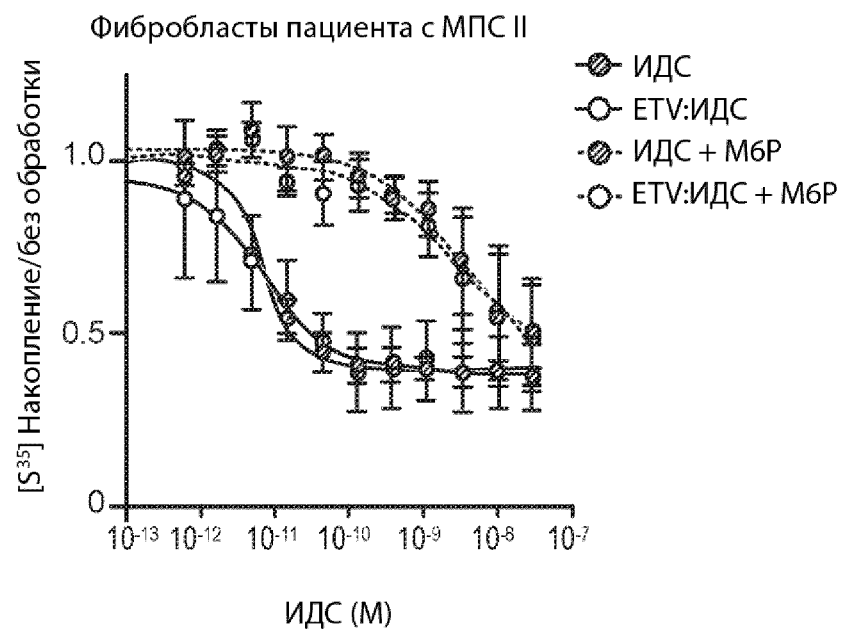
Фиг. 5А



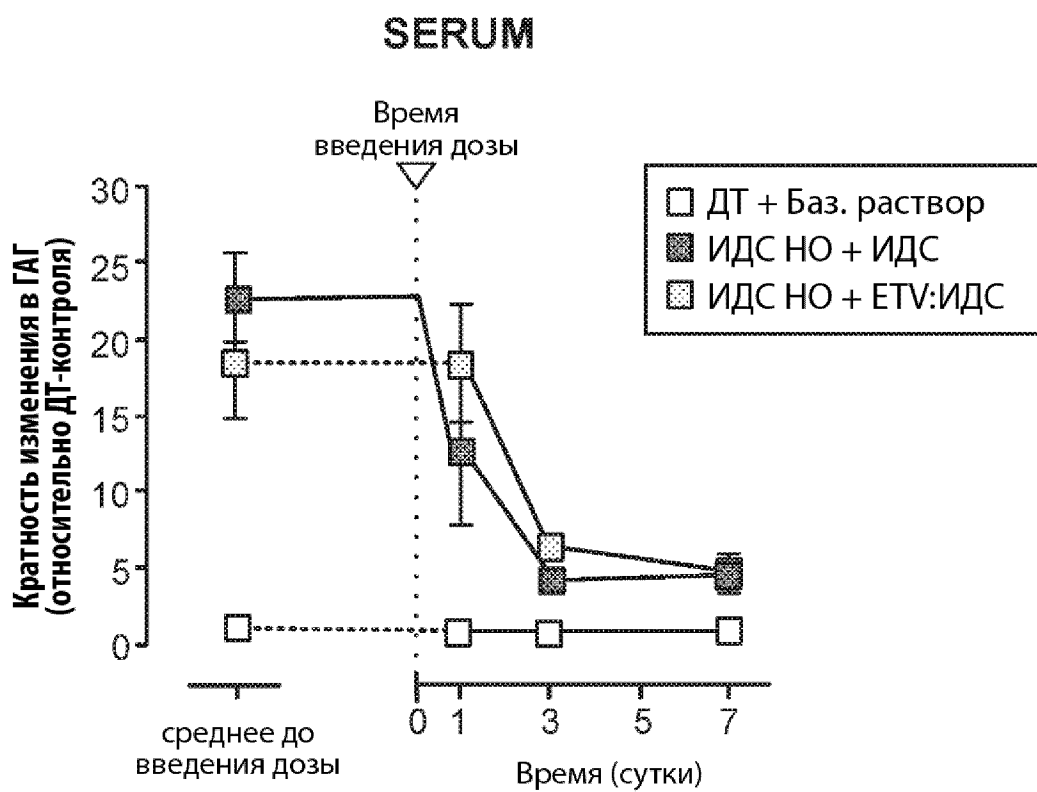
Фиг. 5В



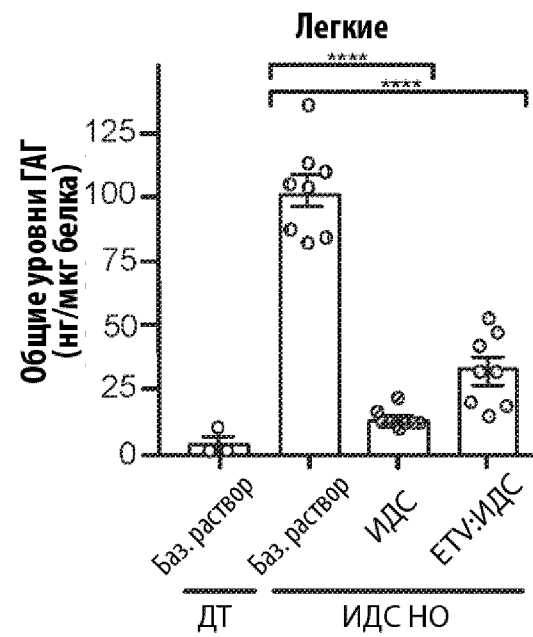
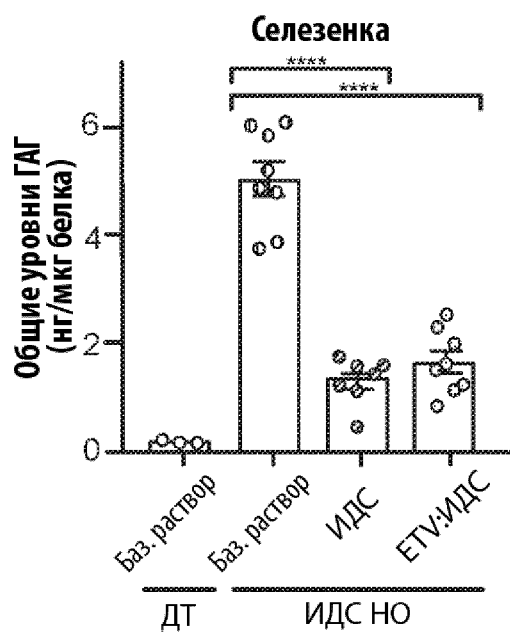
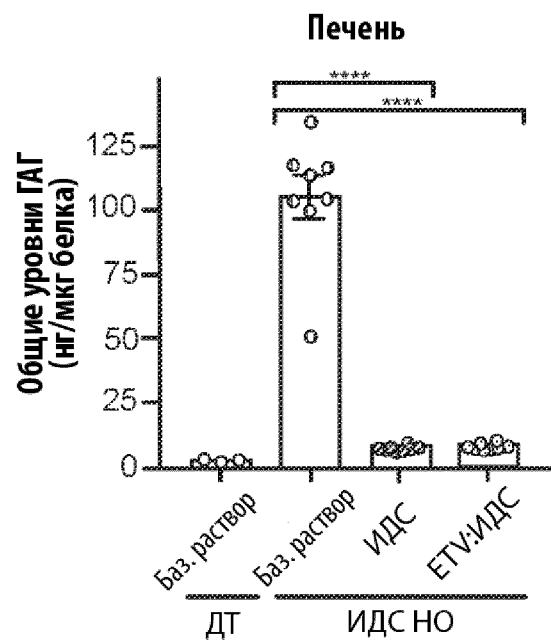
Фиг. 5C



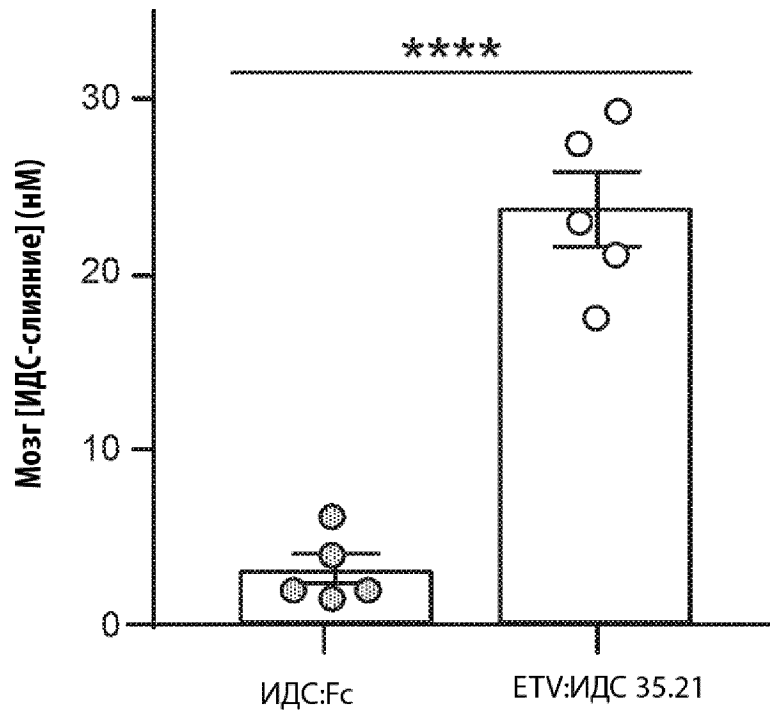
Фиг. 5D



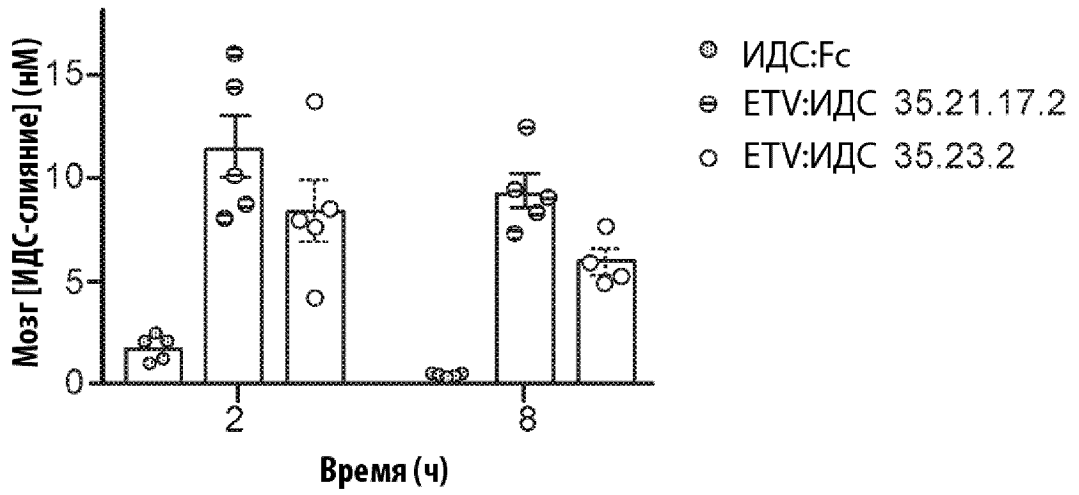
Фиг. 6



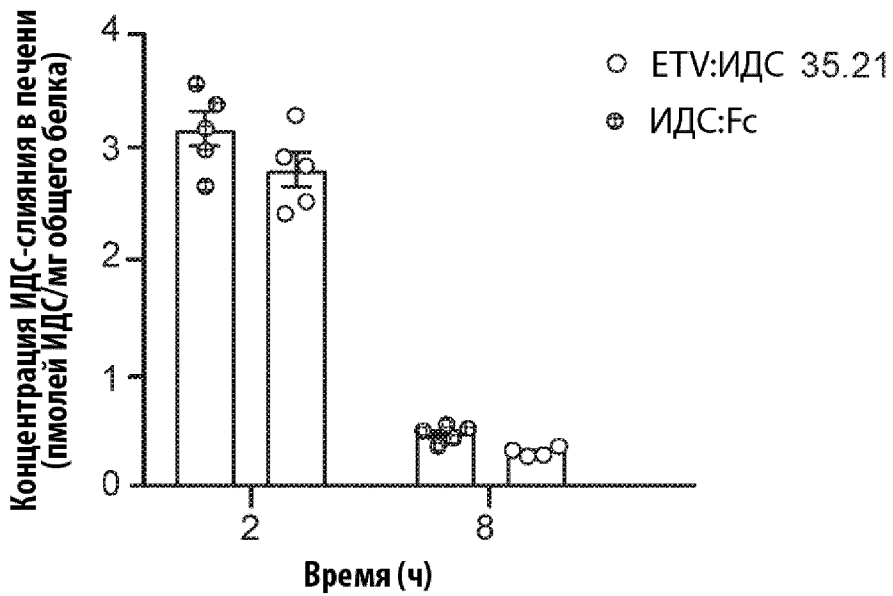
Фиг. 7



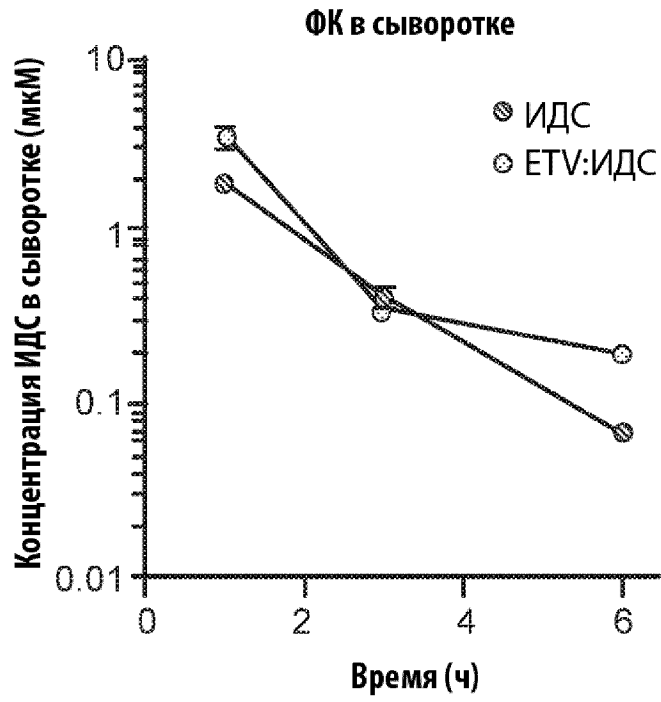
Фиг. 8



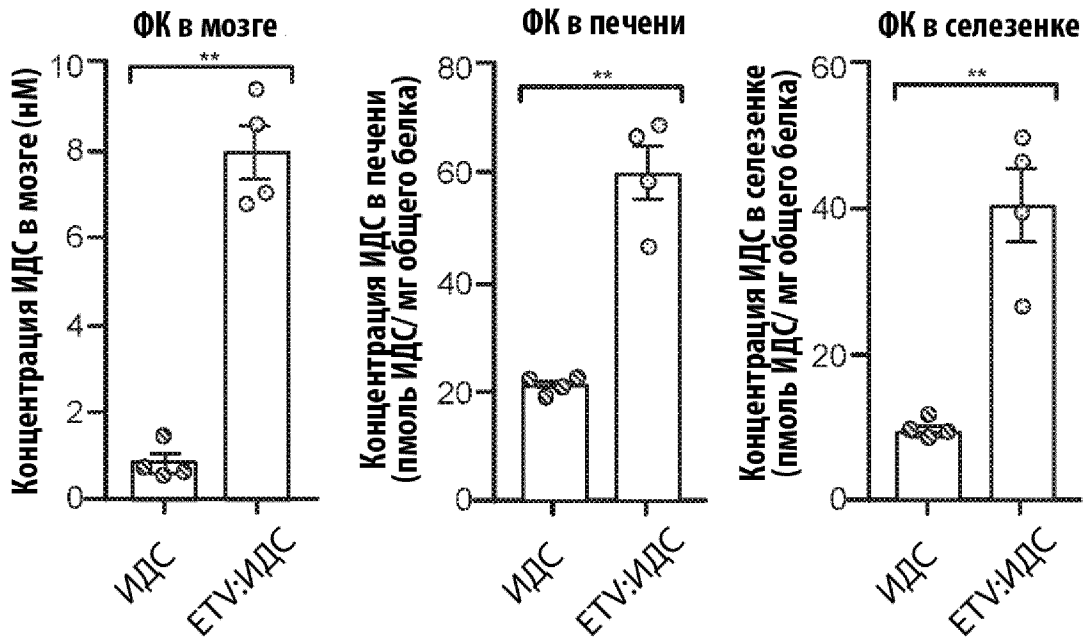
Фиг. 9А



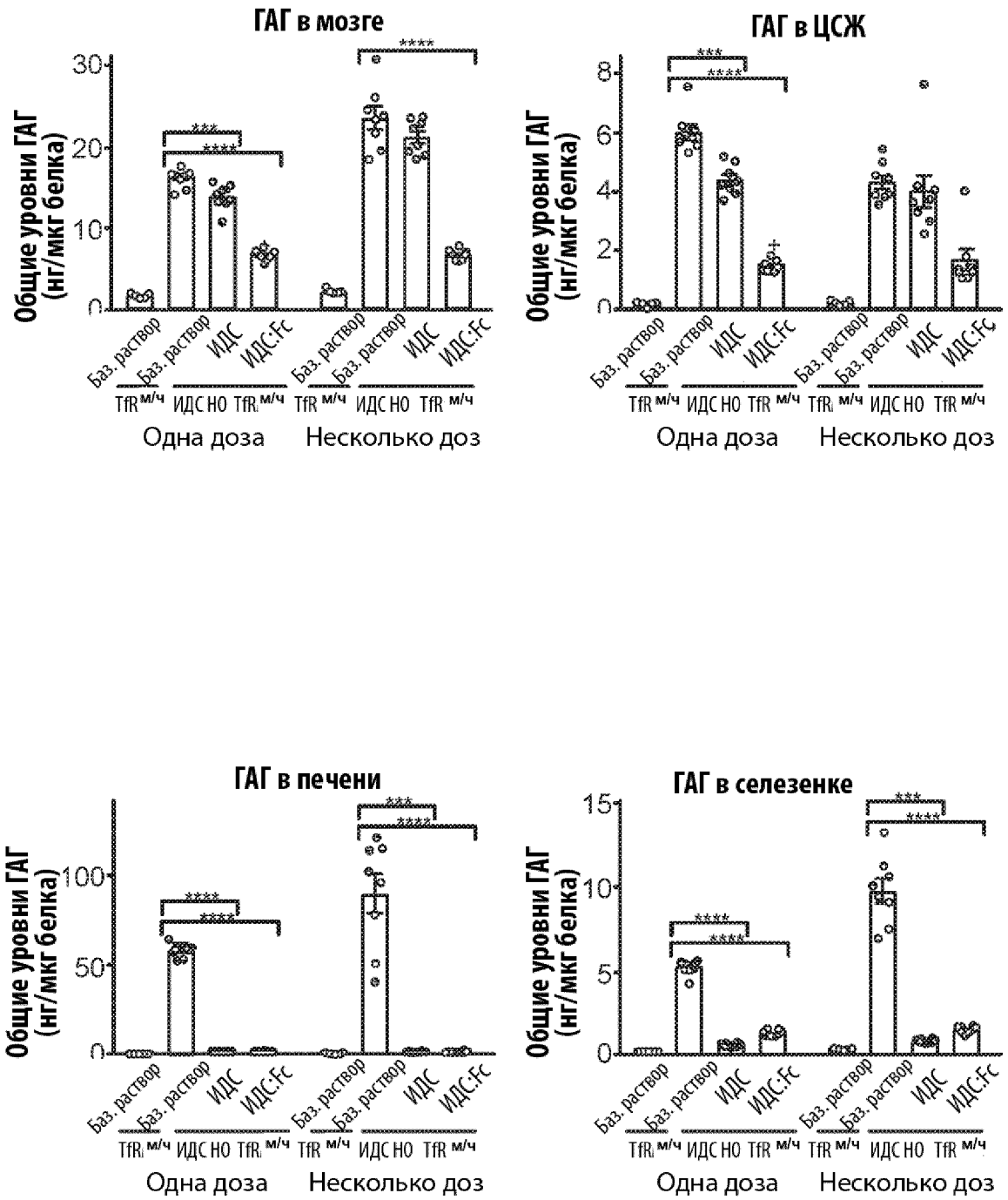
Фиг. 9А



Фиг. 10А

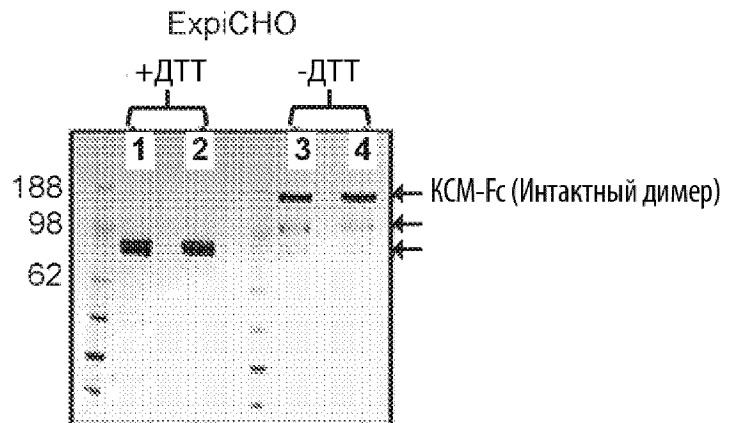
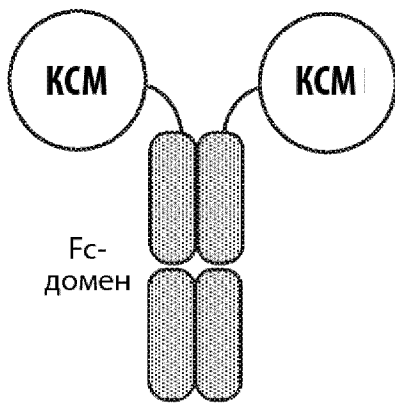


Фиг. 10В



Фиг. 10С

Супернатанты КСМ-Fc после очистки с протеином А

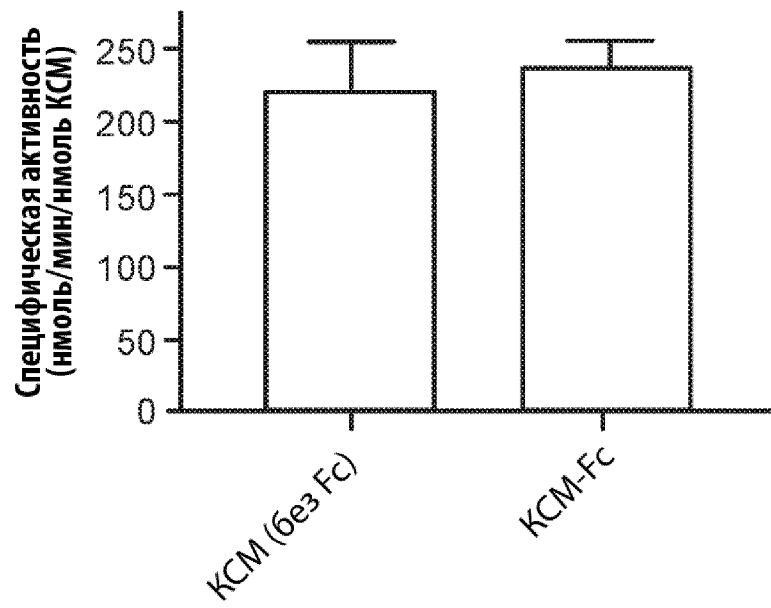


Полоса: 1&3 Mab, элюирование высокой конц. соли
 Полоса: 2&4 Mab, элюирование при низком рН

Окрашивание кумасси

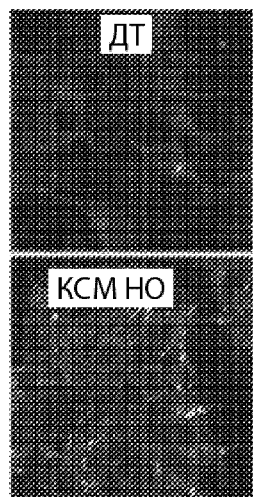
Фиг. 11

Биохимическая активность КСМ-Fc

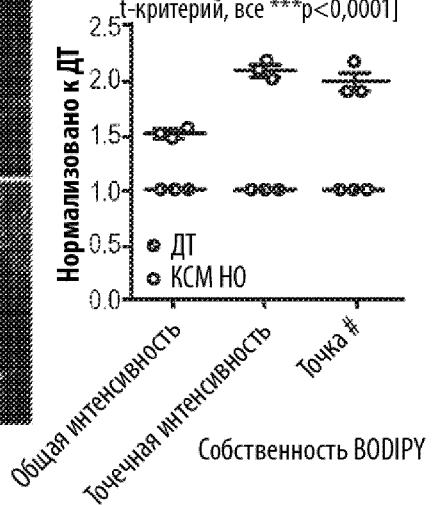


Фиг. 12

**КЛЕТКИ КСМ НО НЕК293 НАКАПЛИВАЮТ
VODIPY-C5-СФИНГОМИЕЛИН**

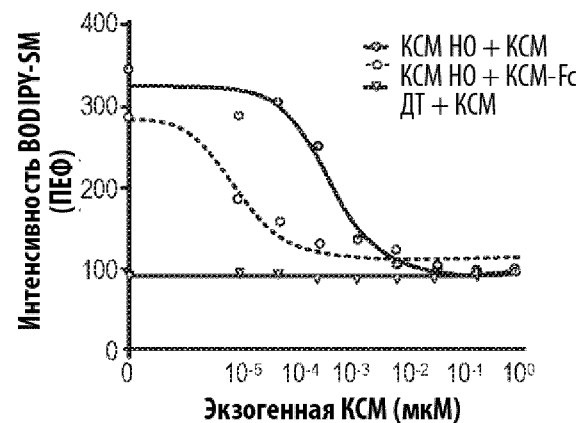
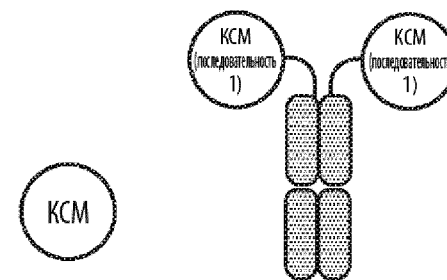
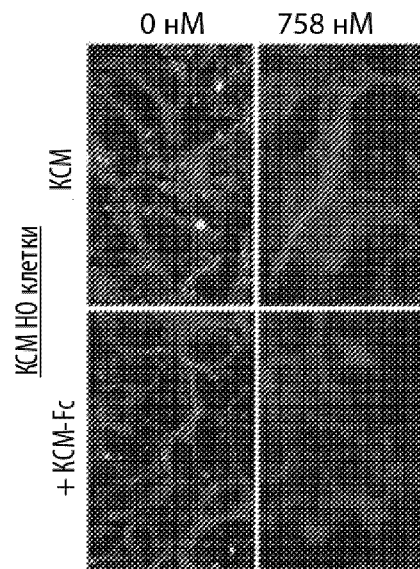


Фенотип vodoru-C5-сфингомиелин
в необработанных клетках
[N = 3, средн., СПС
t-критерий, все ***p < 0,0001]

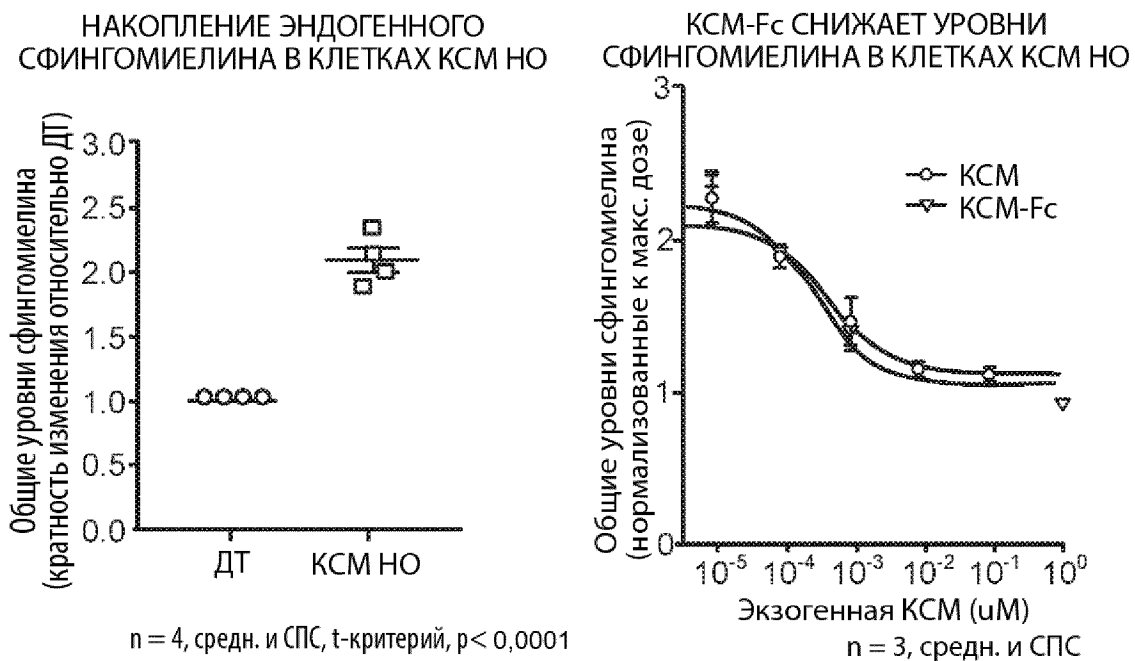


КСМ-Fc ОБРАЩАЕТ НАКОПЛЕНИЕ СФИНГОМИЕЛИНА В КЛЕТКАХ КСМ НО

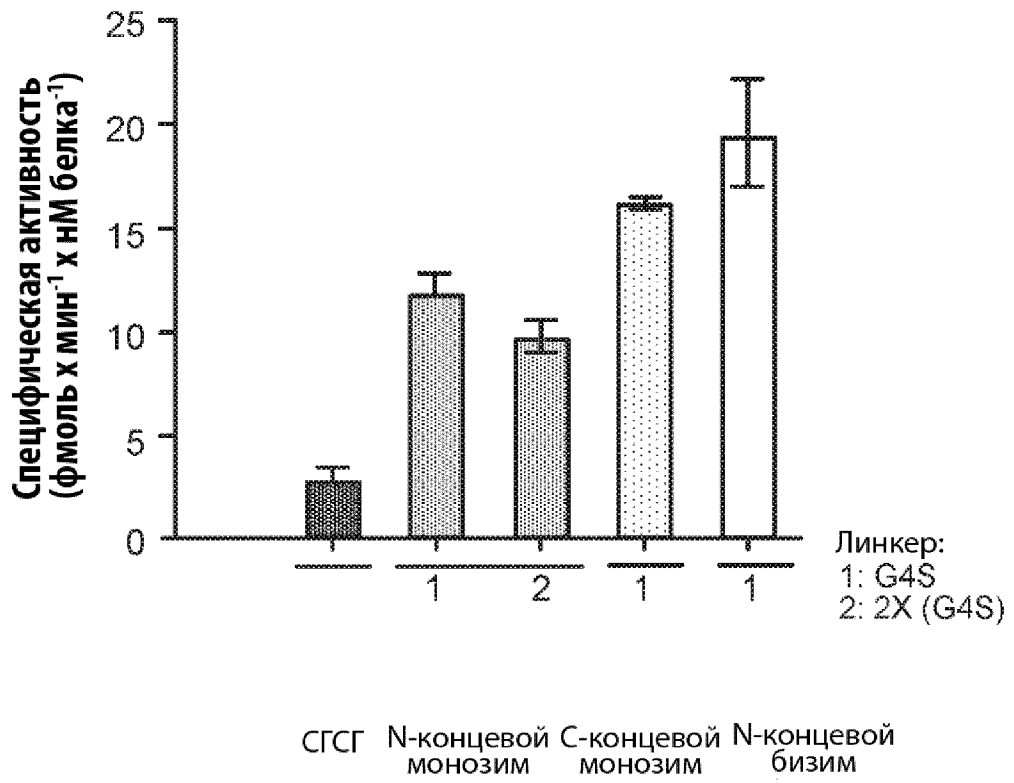
Экзогенная рекомбинантная КСМ



Фиг. 13

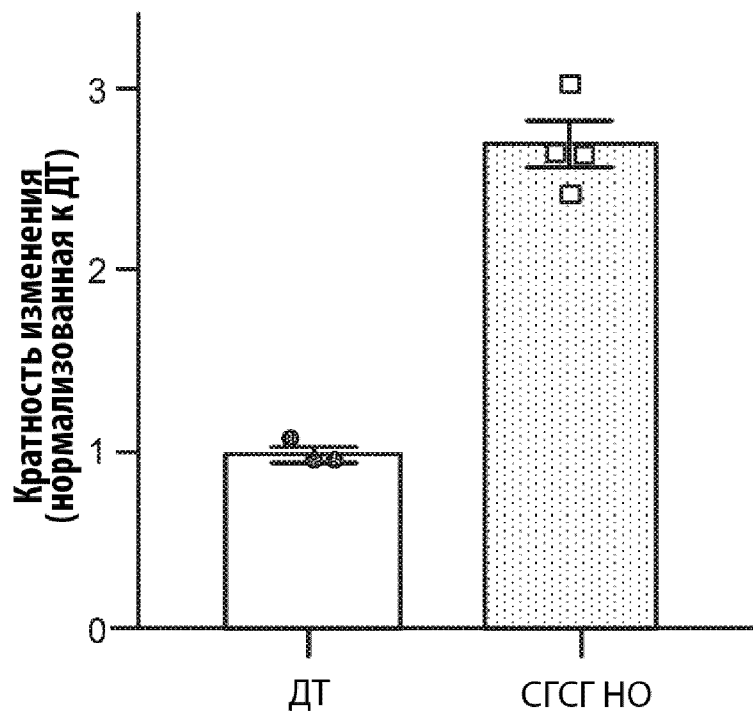


Фиг. 14

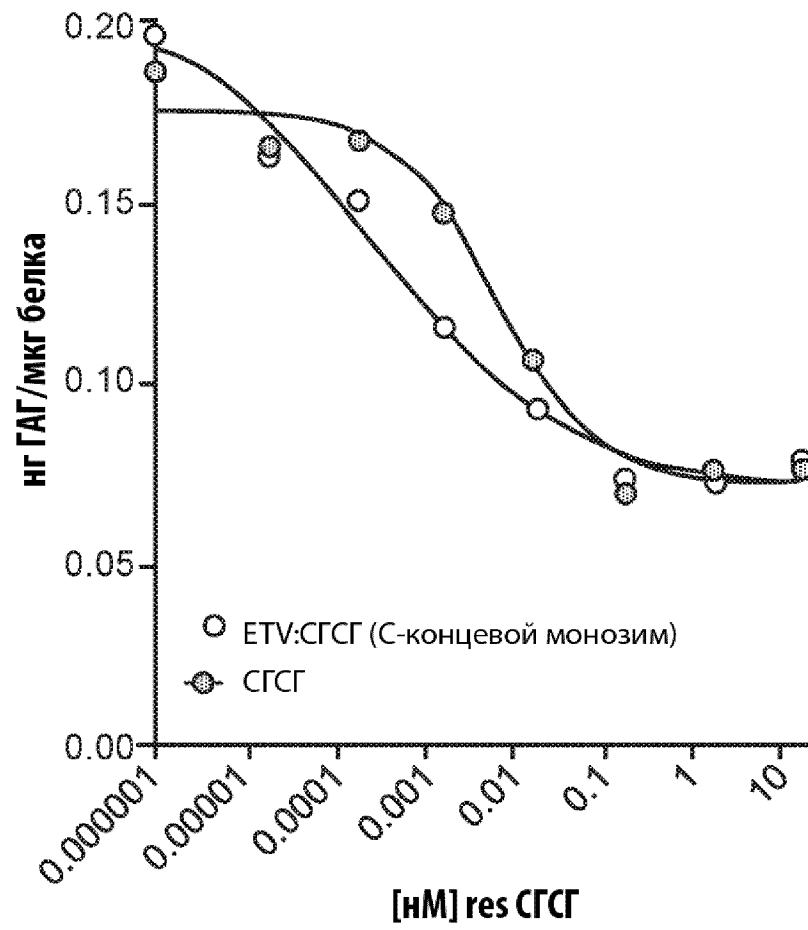


Фиг. 15

Уровни гепарансульфата

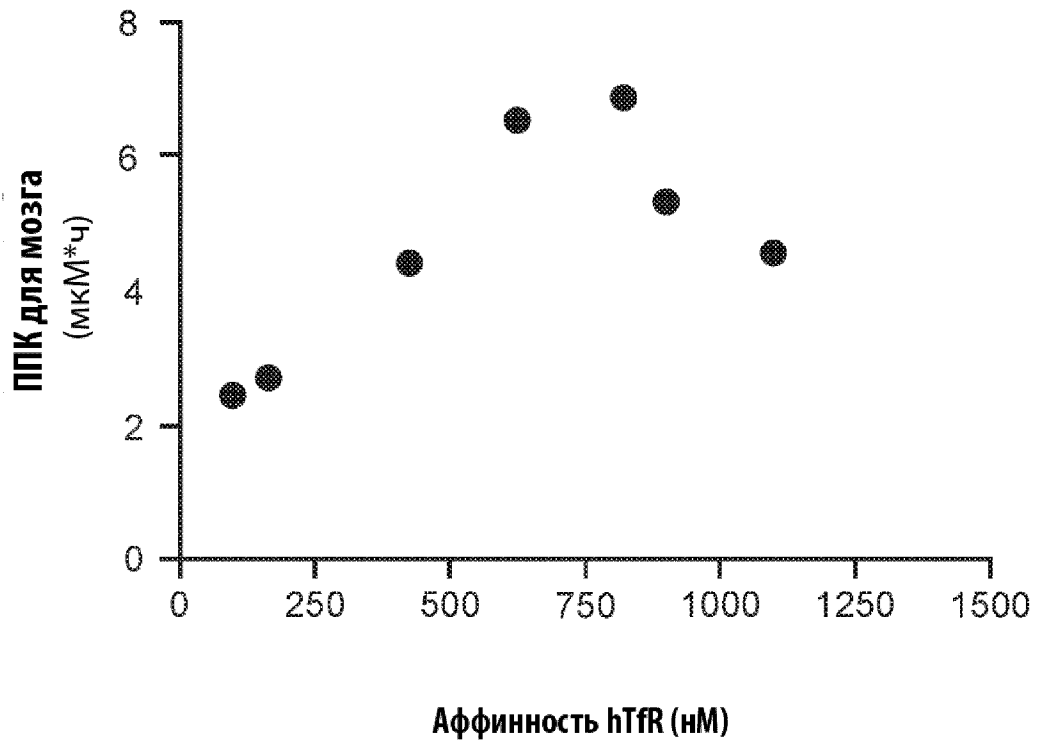


Фиг. 16

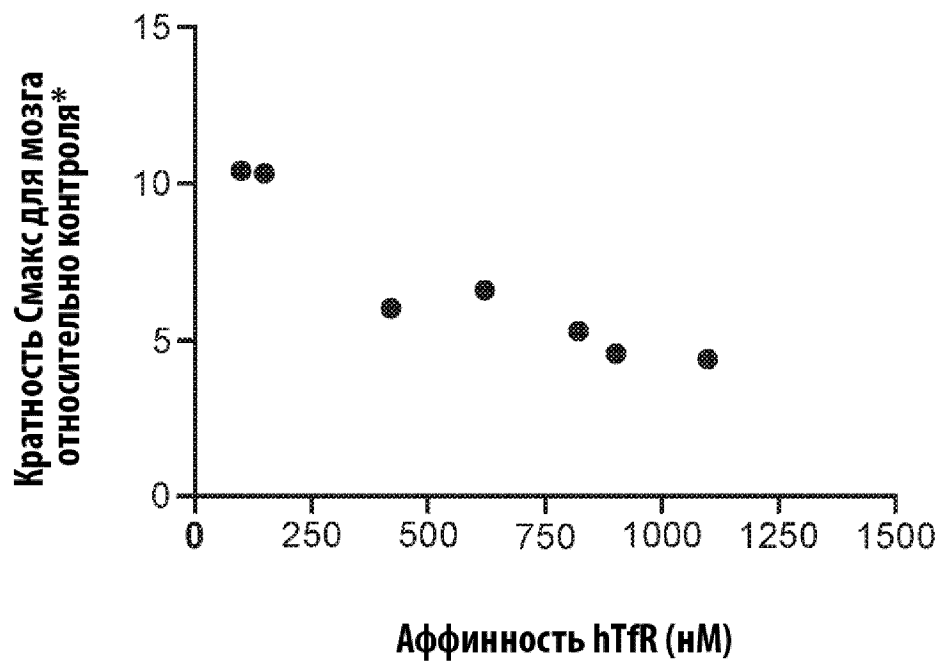


Фиг. 17

ППК для мозга – Кд hTfR

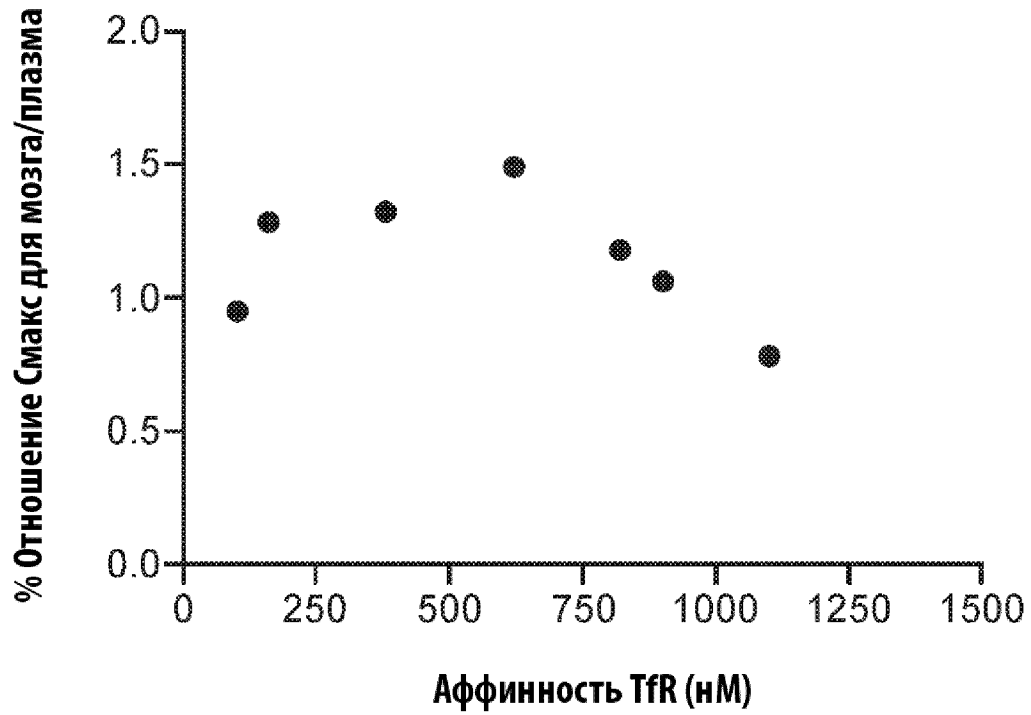


Фиг. 18

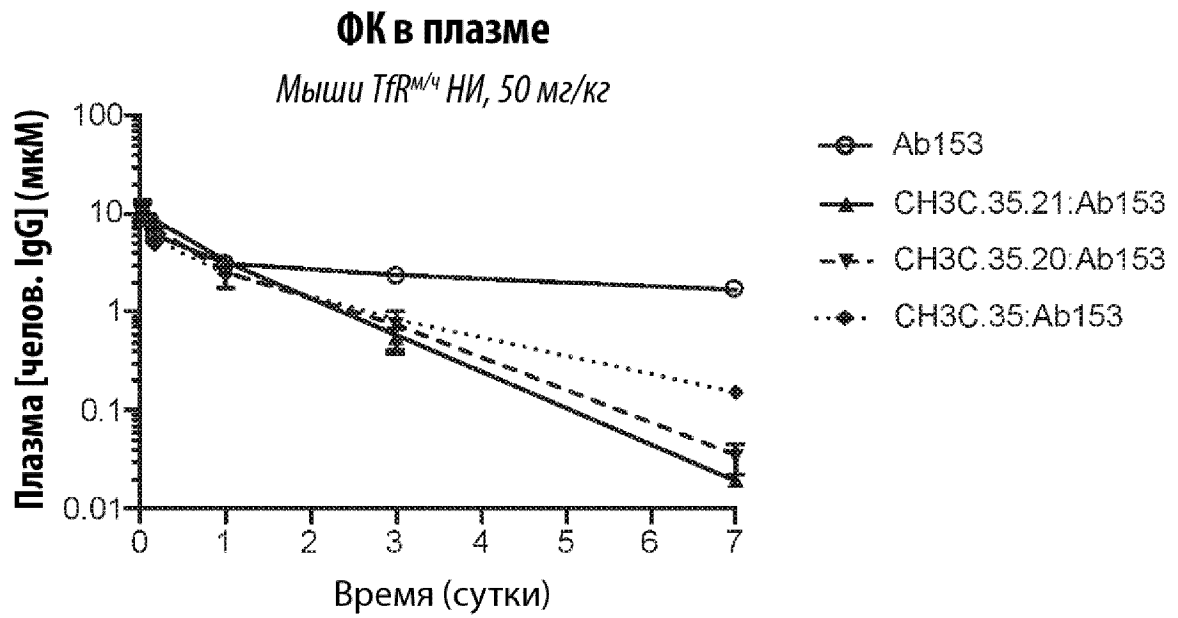
Кратность Смакс – аффинность hTfR

*Кратность относительно Смакс анти-BACE1 в том же исследовании

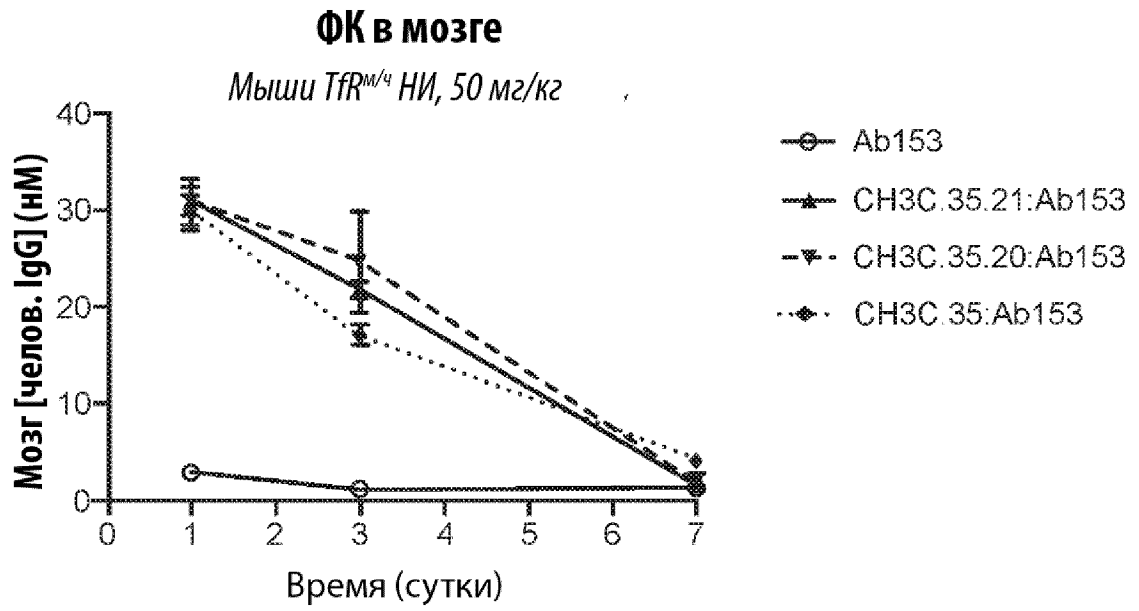
Фиг. 19

Отношение C_{max} для мозга/плазма – аффинность hTfR

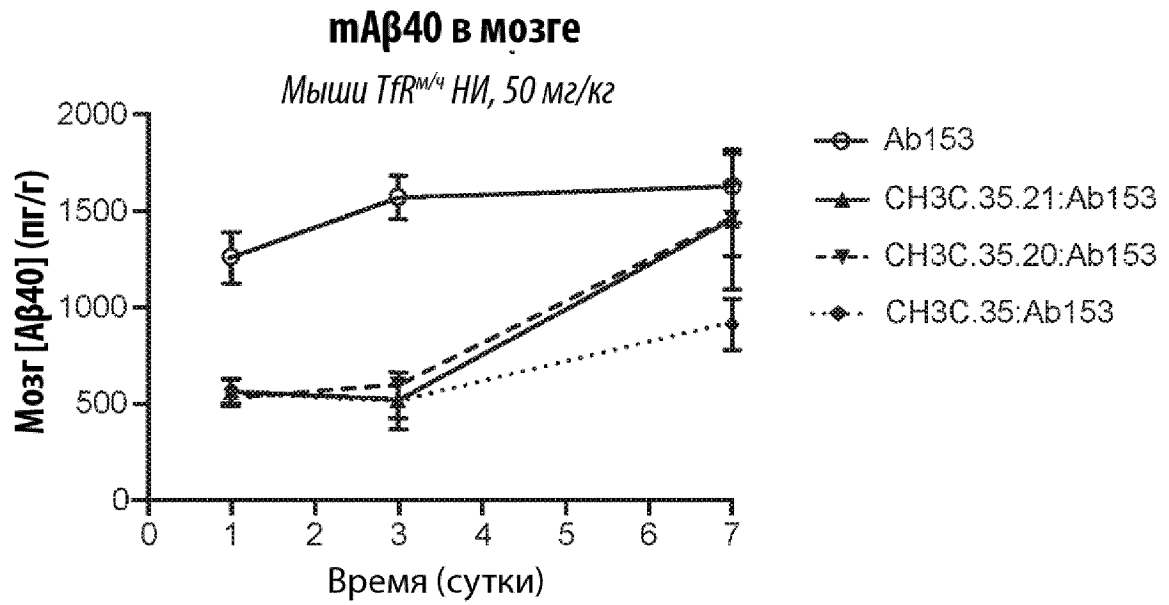
Фиг. 20



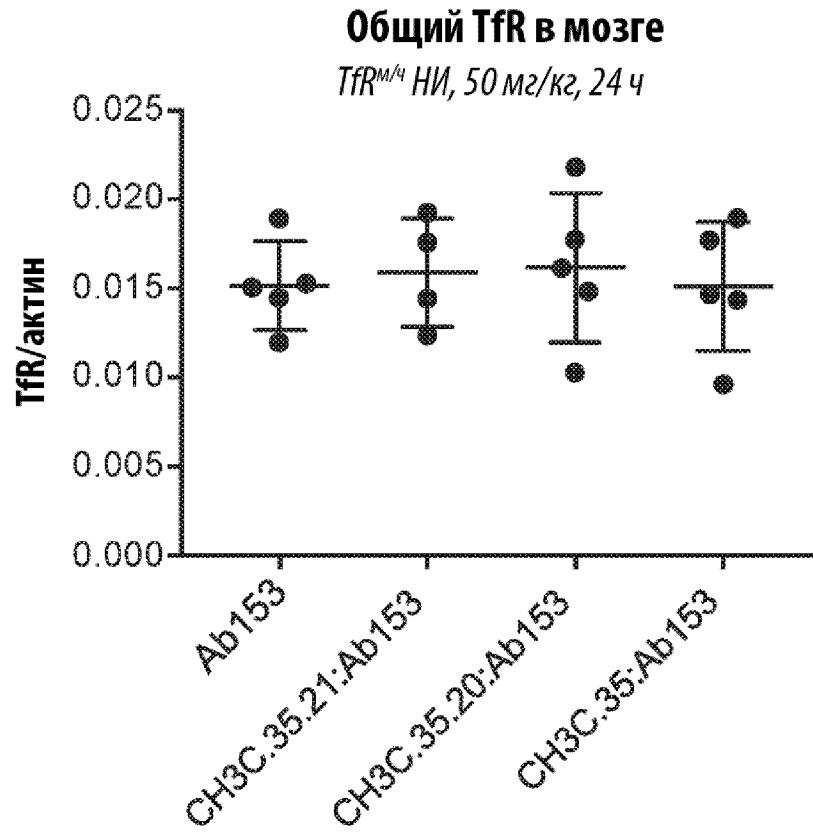
Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 21С



Фиг. 21D