

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037848**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.27

(21) Номер заявки
201600575

(22) Дата подачи заявки
2016.07.14

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(54) ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ, ПРОДУЦЕНТ, ПРЕПАРАТ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩА (ВАРИАНТЫ)

(43) **2018.01.31**

(96) **2016000061 (RU) 2016.07.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"БИОХИМИЧЕСКИЙ АГЕНТ" (RU)**

(56) WO-A1-2015035395
US-B2-9133259
US-B2-8932589

(72) Изобретатель:
**Духовлинов Илья Владимирович,
Федорова Екатерина Алексеевна (RU)**

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине, ветеринарии. Предложена группа изобретений: гибридный белок, включающий лиганд к белку MATN1, и фактор роста из EGF, TGF, FGF, IGF, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, охарактеризованы последовательностью аминокислот на чертеже; такой гибридный белок, дополнительно содержащий Fc-фрагмент антитела, либо полипептид, связывающийся с FcRn, и/или трансферрин, либо его фрагмент, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, охарактеризованы последовательностью аминокислот на чертеже; кодирующий полинуклеотид, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента либо таргетного организма, генетическая конструкция для синтеза в клетках продуцента либо таргетного организма гибридного белка, продуцент гибридного белка, продуцент генетической конструкции на основе бактериальной клетки, препарат для регенерации хряща, содержащий от 1 гибридного белка, либо генетической конструкции в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор для парентерального или в случае препарата на основе от 1 гибридного белка, содержащего транспортный домен, перорального введения, в последнем случае препарат заключен в энтеросолюбильное покрытие, все варианты.

B1**037848****037848****B1**

Группа изобретений относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине, ветеринарии и может быть использована для регенерации хряща.

Хрящ - это разновидность соединительной ткани; хрящ является либо частью кости, которая способствует обеспечению ее подвижности, либо отдельным анатомическим образованием вне скелета. В непосредственной связи с костью находятся суставные хрящи, межпозвоночные диски, хрящи уха, носа, лобкового симфиза. Отдельные анатомические образования составляют группу хрящей воздухоносных путей (гортани, трахеи, бронхов), стромы сердца. Хрящи выполняют интегративно-буферную, амортизационную, формоподдерживающую функции, участвуют в развитии и росте костей. Биомеханические функции осуществляются за счет упругоэластических свойств хряща.

Заболевания и проблемы, связанные с хрящевой тканью, можно условно разделить на три большие группы. К первой группе относят заболевания, которые могут быть связаны с пороками развития (например, анкилоз, дисплазия) (Н.С. Косинская, Нарушения развития костно-суставного аппарата, изд. Медицина, 1966). Ко второй группе относят заболевания, вызванные дегенеративными изменениями хрящей при старении и многих дистрофических процессах (например, остеоартрит, остеохондроз), нарушениях обменных процессов (например, остеопороз, подагра, артроз, болезнь Кашина-Бека, охроноз), а также системные заболевания (ревматизм, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия и др.). К третьей группе относят повреждения хрящевой ткани, которые возникают в результате действия физических (механических, термических и др.), химических и других травмирующих агентов (например, перихондрит, трансхордальный перелом, повреждения хряща вследствие микротравм) (Многотомное руководство по хирургии, под ред. В.В. Петровского, т. 5, М. -Л., 1960.).

Статистика ВОЗ свидетельствует: различными болезнями опорно-двигательного аппарата страдает 80% населения трудоспособного возраста от 30 до 50 лет. По официальной статистике десятки миллионов людей страдают теми или иными заболеваниями хрящевой ткани и ещё больше тех, кто не обращается за помощью к специалистам. Так, например, число зарегистрированных случаев артрита возросло почти вдвое за последние 20 лет, и, похоже, что данная тенденция будет увеличиваться с каждым годом. Если интерпретировать статистические данные, получится, что каждый год 1% россиян ставится диагноз "артрит" и приблизительно настолько же сокращается число здоровых американцев. На долю только артроза, артрита и остеопороза приходится приблизительно 3% населения России или США. От остеоартроза страдает примерно 4% населения Земли и в 10% случаев именно остеоартроз является причиной инвалидности. По оценкам различных специалистов до 85% взрослого населения России сталкиваются с данным заболеванием. Кроме того, по данным ВОЗ 2009 года в мире было зарегистрировано около 20-50 млн травм, приведших к различным проблемам с опорно-двигательным аппаратом или послуживших причинами инвалидности, а данные за 2013 год свидетельствуют о том, что ежегодно от травм позвоночника страдает до 500 тысяч человек (http://spinet.ru/public/dinamika_rasprostraneniya_oda.php). Также следует отметить, что лечение хрящей является главной проблемой в спортивной травматологии: повреждение хрящевой ткани обуславливает уход из спорта, поскольку ее восстановления на данный момент крайне сложно добиться при незначительных повреждениях, а при серьезных повреждениях - невозможно.

В настоящее время при повреждениях хрящей чаще всего используют средства для снятия болевого синдрома - для лечения симптоматических болей, - нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), которые применяют орально или местно в виде гелей (Зупанец И.А. и др. Фармацевтическая опека: симптоматическое лечение суставной и мышечной боли, Провизор, 2002, выпуск 12). Однако важно именно восстановить структуру хряща, болевой синдром - это вторичное явление при повреждениях. Для восстановления целостности хряща в настоящее время применяют лекарственные средства - хондропротекторы на основе хондроитинсульфата и глюкозамина. Однако требуется длительный курс в течение нескольких месяцев ежедневного приема для улучшения состояния, причем данные препараты эффективны только при незначительном поражении хряща. Данные препараты лишь стимулируют синтез существующими клетками компонентов матрикса. Однако, по мнению авторов, ключевую роль в восстановлении хряща играет количество клеток. Поскольку в норме, а тем более при повреждении хряща, данные клетки присутствуют в небольшом количестве, то влияние на них для интенсификации синтеза компонентов матрикса лишь незначительно улучшит состояние хряща.

Известно изобретение, описанное в US 9133259 B2 (19.04.2012), которое относится к белковым комплексам, содержащим олигомерный белок матрикса хряща (COMP), соединенный с одним или несколькими факторами роста (например, или TGFβ1, или FGF, или оба указанных фактора) для стимуляции хондрогенеза и/или остеогенеза и восстановления структур костей и хряща. В одном из воплощений фактором роста является TGFβ1 или различные классы BMP (морфогенетический белок кости). В описании изобретения раскрыто, что в наиболее предпочтительном воплощении белковый комплекс находится внутри саморассасывающейся матрицы, представляющей собой пластинку или костный трансплантат. Матрица дополнительно содержит коллаген или фибрин. Для достижения терапевтического эффекта белковые комплексы должны быть приведены в контакт с пораженным участком хряща или кости или имплантированы в них. Однако это является инвазивным и трудоемким методом, имеющим осложнения.

Авторами настоящего изобретения предложен гибридный белок (варианты), включающий лиганд к белку MATN1 и белок EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, компоненты конструкции соединены гибким мостиком.

MATN1 (matrilin) - белок матрицы хряща. Мутации гена, кодирующего данный белок, связывают с различными наследственными хондродисплазиями и идиопатическим сколиозом (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4146>, Montanaro L. et al., "Evidence of a linkage between matrilin-1 gene (MATN1) and idiopathic scoliosis". *Scoliosis* 1: 21, 2006)

EGF (Epidermal Growth Factor) - эпидермальный фактор роста, белок, стимулирующий клеточный рост и клеточную дифференцировку эпителиального покрова. Данный белок действует посредством связывания с рецептором эпидермального фактора роста на поверхности клеток, что стимулирует активность внутриклеточных тирозинкиназ (Dawson JP et al "Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface ", *Mol. Cell. Biol.* 25: 17, 2005).

TGF (Transforming growth factor) - трансформирующий фактор роста, состоящий из двух классов полипептидных факторов роста, TGF α и TGF- β . TGF α индуцирует развитие эпителиальной ткани. TGF- β представлен тремя подтипами TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. Данные белки играют решающую роль в регенерации тканей, дифференцировке клеток, эмбриональном развитии. TGF действуют посредством связывания с рецепторами, которые, в свою очередь, фосфорилируют специфические сигнальные эффекторы, вызывая образование комплексов сигнальных белков. Образующиеся комплексы транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они регулируют транскрипцию специфических генов (Matt. P et al., "Circulating transforming growth factor- β in Marfan syndrome". *Circulation* 120 (6): 526-32, 2005).

FGFs (Fibroblast growth factor) - факторы роста фибробластов. Это семейство факторов роста, участвующих в ангиогенезе, заживлении ран и эмбриональном развитии. Было доказано, что для передачи сигнала факторов роста фибробластов необходимы взаимодействия с расположенными на поверхности клеток протеогликанами. Факторы роста фибробластов играют ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки широкого спектра клеток и тканей (https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Developmental_Signals_-_Fibroblast_Growth_Factor; <http://dic.academic.ru/dic.nsf/rawiki/188282>).

IGF - Инсулиноподобный фактор роста человека первого типа (ИФР-1, IGF-1), пептидный ростовой фактор, опосредующий ростостимулирующие эффекты соматотропного гормона (СТГ), представляет собой полипептид, состоящий из 153 аминокислот, с молекулярной массой около 17 кДа. Под влиянием СТГ ИФР-1 образуется в печени и других тканях. ИФР-1 стимулирует пролиферацию клеток большинства тканей, прежде всего костных, хрящевых и мышечных. ИФР-1 является анаболическим агентом, для которого было продемонстрировано улучшение метаболизма (Meyer N.A. et al. 1996. *J. Trauma* 31 (6): 1008-1012) после различных типов повреждения. Обработка ИФР-1 улучшает заживление тканей (Martin, P. 1997. *Science* 276: 75-81. 1997; Steenfoss H. 1994. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 28: 95-105; Pierre et al. 1997. *J Bum Care Rehab* 18 (4): 287-291).

Предложенный авторами настоящего изобретения гибридный белок - тропный к матриксу хряща, за счет того, что содержит лиганд к белку матрицы хряща MATN1 (matrilin) соответственно, его можно вводить как парентерально, так и системно, что облегчает его применение. Данный белок также содержит фактор роста из EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF. Компоненты гибридного белка соединены гибким мостиком, что позволяет достигать функционирования каждого компонента белка.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в упрощении лечения повреждений хряща. Это достигается за счет отсутствия обязательной необходимости введения белка, либо препарата локально, благодаря адресной доставке благодаря использованию в структуре гибридного белка элемента, связывающегося исключительно с белком хрящевой ткани, причем именно предложенного авторами. Также данный технический результат достигается при локальном введении за счет более простой формы введения, инъекционной, без необходимости использования матрицы особого состава, которую необходимо предварительно сконструировать.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в увеличении безопасности и, соответственно, уменьшении осложнений от терапии повреждений хряща за счет использования более безопасных инструментов доставки гибридного белка к хрящу.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в увеличении эффективности лечения повреждений хряща, благодаря более равномерному распределению гибридного белка в хрящевой ткани, за счет тропности к белку матрикса, в противовес, по прототипу, четко определенному месту введения при введении в составе матрицы или даже инъекционно.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) заключается также в расширении спектра действующих веществ или препаратов, соответственно, для восстановления структуры хряща. При противопоказаниях к применению аналогов, либо нежелании использовать аналоги ввиду их вышеописанных недостатков, данный белок, либо пре-

парат, имеющий иной принцип работы, позволит осуществить регенерацию хряща. В связи с тем, что проблема регенерации хряща стоит очень остро, а выведение на рынок препарата удастся не многим, предложенное изобретение позволит увеличить шансы в борьбе с данным широко распространенным недугом.

Авторами настоящего изобретения также предложена генетическая конструкция (варианты) для экспрессии гибридного гена в клетках продуцента, либо таргетного организма (варианты), кодирующая гибридный белок (варианты), включающий лиганд к белку MATN1 и белок EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, соединенные гибким мостиком. Также предложен препарат на основе от 1 такой конструкции, для парентерального введения. Такая конструкция и препарат на ее основе не известны из уровня техники. Преимущества и технический результат указанной генетической конструкции и препарата на ее основе - те же, что и гибридного белка, однако имеются и дополнительные преимущества.

Так технический результат заключается также в увеличении длительности эффекта и достигается тем, что используют генетическую конструкцию, с которой после введения в организм синтезируется гибридный белок; а также тем, что данная генетическая конструкция содержит элементы, обуславливающие стабильность мРНК и, соответственно, увеличивающие время полужизни мРНК, в результате синтез белка с одной молекулы мРНК осуществляется большее количество раз, а также в результате увеличивается количество синтезируемого белка; а также тем, что нуклеотидная последовательность гибридного гена кодонно оптимизирована для экспрессии в таргетном организме, в результате синтез белка идет интенсивнее. При внедрении в практику это позволит существенно снизить количество вводимой плазмидной ДНК (в 10-50 раз), по сравнению с дозами, используемыми в настоящее время в отечественной и мировой практике при генной терапии.

Помимо этого технический результат заключается в увеличении безопасности. Указанный технический результат достигается тем, что синтезируемый в организме с генетической конструкции белок подвергается естественному посттрансляционному процессингу, а также обеспечивается правильный фолдинг белка за счет клеточных шаперонов. Указанный технический результат достигается и за счет наличия в генетической конструкции таких регуляторных последовательностей, как сайленсер и/или инсультатор, в одном из вариантов изобретения, благодаря чему также осуществляется контроль над количеством синтезируемого белка, и, в принципе, синтезом белка, как таковым, и, соответственно, над действием препарата: при необходимости есть возможность в короткий срок остановить, либо уменьшить экспрессию гена. В последнем варианте возможно и осуществление тканеспецифической экспрессии при необходимости.

Технический результат также заключается в упрощении и удешевлении производства регенераторного препарата за счет избегания производства и процессов очистки белковых препаратов *in vitro*, благодаря тому, что синтез белка происходит *in vivo*. Производство, очистка и хранение ДНК-препаратов экономически выгоднее, чем белковых, так как первые более стабильны, их можно нарабатывать в больших количествах с меньшими затратами.

Получение лекарственного средства для восстановления структур хряща, которое было бы удобно для приема, является важной задачей современной медицины и ветеринарии. Пероральный путь введения лекарственных средств - самый простой, безопасный и является наиболее распространенным. Преимущественно данным способом назначают прием для лекарств, которые хорошо всасываются слизистой оболочкой желудка или кишечника. Терапевтический уровень лекарства в крови достигается через 30-90 мин после его приема и сохраняется в течение 4-6 ч в зависимости от свойств активного ингредиента и состава препарата. Достоинствами данного способа введения являются возможность введения различных лекарственных форм (порошков, таблеток, пилюль, драже, отваров, микстур и др.), простота и доступность метода; также способ не требует соблюдения стерильности. К недостаткам перорального применения лекарственных средств следует отнести более медленное, чем при других способах приема лекарств, развитие терапевтического эффекта; скорость и биодоступность индивидуальны для каждого пациента, так как на них оказывают влияние пища, органическое и функциональное состояние ЖКТ, приём других лекарственных препаратов; пероральный приём неэффективен для лекарственных препаратов, плохо всасывающихся или разрушающихся в органах ЖКТ; также пероральный приём затруднён или невозможен при рвоте и при нахождении больного в бессознательном состоянии (<http://sestrinskoe-delo.ru/puti-i-sposobi-primeneniya-lekarstvennich-sredstv>).

Из документа WO 2013059885A2 (02.05.2013) известны полипептидные конструкции, содержащие пептидный или полипептидный сигнальный лиганд, связанный с антителом или его антигенсвязывающей частью. Время полувыведения антитела из сыворотки и биораспределение могут быть изменены на основании модификации взаимодействия между антителом и неонатальным Fc рецептором (FcRn). В документе не представлена информация о возможности перорального введения таких конструкций.

В документах RU 2562232 C2 (03.11.2009) и RU 2489423 (02.02.2007) предложены аналоги ДНК-алкилирующего средства CC-1065 и их конъюгаты для селективной доставки и/или контролируемого высвобождения одного или нескольких ДНК-алкилирующих средств. Данные типы конъюгатов авторы изобретения предлагают применять для лечения заболеваний, вызванных нежелательной клеточной пролиферацией (опухолевые заболевания). Конъюгаты могут включать различные белки, например транс-

феррин, или эпидермальные факторы роста (EGF), или интерлейкины (IL-2, IL-6), или трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β , или другие. Также часть конъюгата представляет собой антитело, имеющее модификации в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют с Fc-рецепторами. Элементы конъюгата связаны между собой линкером, например таким, который включает триазольную группу, также линкером может быть одинарная связь (-C(O)-, -O-, -S-). Предпочтительно линкер имеет небольшой размер (линкер, у которого не более чем 4 связывающих атома). Фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты, авторы изобретения предлагают вводить различными путями (пероральное введение, местное применение или путем инъекции). Однако возможна неспецифическая доставка конъюгата и его проникновение в нецелевые клетки.

Из документа US 8932589 (B2) (12.03.2013) известны композиции, содержащие слитый белок, который включает белок Клото или его фрагмент, FGF или его фрагмент и возможно модифицированный Fc-фрагмент, который повышает аффинность или период полувыведения в сыворотке. Белок Клото или его активный фрагмент способен связываться с рецептором FGF. Компоненты слитого белка могут быть соединены друг с другом пептидной связью или посредством линкера. Композиции применяют для лечения метаболических расстройств и возрастных заболеваний (включая такие заболевания, как остеопороз и остеоартрит). Композиции представлены в твердой, жидкой форме или в виде аэрозоля, композиции можно вводить различными путями, в т.ч. перорально, но наиболее предпочтительным является внутривенное введение - капельное введение или болюсная инъекция. Хотелось бы отметить, что белок Клото не является специфичным для хрящевой ткани.

Предложенный авторами настоящего изобретения гибридный белок - тропный к матриксу хряща, за счет того, что содержит лиганд к белку матрицы хряща MATN1. Данный белок также содержит фактор роста из EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, а также Fc-фрагмент антитела, либо полипептид, связывающийся с FcRn, для парентеральной, либо пероральной доставки. Компоненты гибридного белка соединены гибкими мостиками, что позволяет достигать функционирования каждого компонента белка.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов), выражается в увеличении эффективности лечения повреждений хряща, поскольку гибридный белок работает только в хрящевой ткани. Это достигается за счет воздействия гибридного белка, либо препарата на его основе исключительно на хрящевую ткань, благодаря использованию предложенного авторами лиганда к матрилину.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов), выражается в увеличении безопасности за счет уменьшения осложнений, отсутствия непредсказуемых результатов от терапии повреждений хряща за счет воздействия гибридного белка, либо препарата, исключительно на хрящевую ткань, благодаря использованию предложенного авторами лиганда к матрилину.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов), заключается также в расширении спектра действующих веществ или препаратов, соответственно, для восстановления структуры хряща.

В документах US 2011092677 (A1) (21.04.2011) и WO 2004020404 (A2) (11.03.2004) описано транстело, содержащее один и более варьируемый домен, либо CDR антител к одному или более разных антигенов для лечения или профилактики заболеваний, а также трансферрин, либо модифицированный трансферрин, которое может лечить в том числе некоторые формы артрита, при использовании в качестве антигена(ов) TNF α . Антигеном(ами) может(гут) быть TGF или EGF или FGF, тогда применение будет иное, но оно не конкретизировано в документе. Иные указанные в документе антигены являются мишенями для блокировки транстелами. Предпочтительно указанные модифицированные группы трансферрина не подвергаются гликозилированию или практически не подвергаются гликозилированию, не связывают железо и/или рецептор трансферрина, что положительно влияет на продолжительность периода полувыведения. Также предложены композиции, содержащие вышеуказанные транстела. Композиции вводят различными путями, парентерально или перорально. Данные транстела для лечения артрита действуют за счет связывания и соответственно блокирования TNF α , причем транстела не таргетны к какой-либо ткани. Таким образом, они не вызывают регенерацию хрящевой ткани. Транстела, связывающиеся с указанным(и) фактором(ами) роста, предназначены мишень блокировать. В случае предложенного авторами настоящего изобретения принцип использования фактора роста иной.

Предложенный авторами настоящего изобретения гибридный белок - тропный к матриксу хряща, за счет того, что содержит лиганд к белку матрицы хряща MATN1. Гибридный белок также содержит фактор роста из EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, а также трансферрин, либо его фрагмент, для парентерального введения, либо для пероральной доставки. Компоненты гибридного белка соединены гибкими мостиками, что позволяет достигать функционирования каждого компонента белка.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в регенерации хряща за счет нацеливания гибридного белка на матрикс хряща, а также привлечения туда и стимуляции роста требуемых клеток, благодаря использованию в конструкции гибридного белка фактора роста.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в увеличении безопасности за счет уменьшения осложнений, отсутствия непредсказуемых результатов от терапии повреждений хряща за счет действия гибридного белка, либо препарата, исключительно в хрящевой ткани, благодаря использованию предложенного авторами лиганда к матрилину.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) заключается также в расширении спектра действующих веществ или препаратов, соответственно, для терапии повреждений хряща, которые могут вводиться перорально.

Описано изобретение в US 9133259 B2 (19.04.2012), которое относится к белковым комплексам, содержащим олигомерный белок матрикса хряща (COMP), соединенный с одним или несколькими факторами роста, например или TGF β 1, или FGF, или оба указанных фактора, для стимуляции хондрогенеза и/или остеогенеза и восстановления структур костей и хряща. Однако в отличие от заявляемого изобретения данная заявка не предлагает орального введения лекарственных средств, содержащих вышеуказанные белковые комплексы. Так в описании изобретения раскрыто, что в наиболее предпочтительном воплощении белковый комплекс находится внутри саморассасывающейся матрицы, представляющей собой пластинку или костный трансплантат. Матрица дополнительно содержит коллаген или фибрин. Для достижения терапевтического эффекта белковые комплексы должны быть приведены в контакт с пораженным участком хряща или кости или имплантированы в них, что является инвазивным и трудоемким методом, имеющим осложнения.

В документе WO 2004/062602 A2 (29.07.2004) предложены композиции и способы для направленной доставки веществ в поляризованные клетки (клетки кишечного эпителия) для лечебных, профилактических или диагностических целей. Композиции содержат конструкцию из нескольких элементов: элемент связывания с поверхностью поляризованной клетки; элемент, обеспечивающий проникновение композиции внутрь клетки; элемент, полипептид или химическая группировка, который, собственно, применяется для лечебных, профилактических или диагностических целей. Например, если композицию применяют для диагностических целей, третий элемент может представлять собой контрастное вещество, для лечебных целей - антитело или фрагмент антитела. Первые два элемента могут представлять собой полипептид, антитело или фрагмент антитела, которые могут связываться, например, с рецептором трансферрина или FcRn. Элементы конструкции ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Композиции предназначены для перорального введения. Однако о дополнительных элементах, позволяющих осуществить таргетную доставку прошедших через слой эпителия молекул, ничего не сказано. В тексте описана только доставка молекул через эпителиальный слой, дальнейший путь вводимых молекул не раскрыт. Соответственно используемый третий элемент конструкции опосредует то, что конструкция либо остается в эпителиальной клетке, либо разносится по организму и оказывает системное воздействие.

Идея создания конструкций или слитых белков, включающих или связывающихся с трансферрином или модифицированным трансферрином, а также включающих Fc-фрагмент антитела или группировку, связывающуюся с FcRn, т.е. такие конструкции или слитые белки содержат и трансферрин, и Fc-фрагмент, для различных целей, например улучшения свойств уже существующих белков, для создания транспортных белков, для получения высокоэффективных терапевтических агентов и т.п., рассмотрена в документах US 8173860 B2 (08.05.2012), WO 2001/046254 A1 (28.06.2011), WO 2012/116453 A1 (07.09.2012), WO 2015/070014 A1 (14.05.2015), WO 2012/170969 A2 (13.12.2012). Для всех из них, кроме описанного в первом документе, предусмотрено пероральное введение. Такие конструкции предпочтительно вводить парентерально. Препаратов для регенерации хряща в их числе не представлено.

В документах RU 2555532 C2 (06.11.2009) и RU 2490278 C2 (19.12.2008) представлены различные варианты антител, специфичных в отношении IL-1R1, который экспрессирован на различных типах клеток, или α -рецептора интерлейкина-4 (hIL-4R α) человека. Заявленные антитела могут быть пригодны для лечения расстройств, опосредованных IL-1R1, включая также ревматоидный артрит, но ключевыми заболеваниями, которые авторы предлагают лечить с помощью указанных антител, являются астма и ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких). Указанные антитела содержат каркас и одну или несколько вариабельных петель, в которых аминокислотная последовательность петли или петлей мутирована для создания антигенсвязывающего участка, который связывается с антигеном-мишенью. Такие конструкции включают трансферрин, а связывающий участок содержит вариант Fc-области, обладающий повышенным связыванием с Fc-рецептором FcRn для увеличения периода полувыведения из сыворотки. Композиции, содержащие указанные конструкции, вводят различными путями, в т.ч. перорально - в виде таблетки или порошка, но преимущественным является парентеральный путь введения. Данное изобретение позволяет замедлять течение болезни, поскольку предложенные антитела блокируют молекулу, опосредующую развитие ревматоидного артрита. Однако оно не способно вызвать регенерацию хряща в требуемом объеме из-за того, что не влияет на количество клеток, синтезирующих вещества матрикса.

Из документа US 8932589 (B2) (12.03.2013) известны композиции, содержащие слитый белок, кото-

рый включает белок Киото или его фрагмент, FGF или его фрагмент и возможно модифицированный Fc-фрагмент, который повышает аффинность или период полувыведения в сыворотке. Белок Киото или его активный фрагмент способен связываться с рецептором FGF. Компоненты слитого белка могут быть соединены друг с другом пептидной связью или посредством линкера. Композиции применяют для лечения метаболических расстройств и возрастных заболеваний, включая такие заболевания, как остеопороз и остеоартрит. Композиции представлены в твердой, жидкой форме или в виде аэрозоля, композиции можно вводить различными путями, в т.ч. перорально, но наиболее предпочтительным является внутривенное введение - капельное введение или болюсная инъекция. Хотелось бы отметить, что белок Киото не является специфичным для хрящевой ткани, соответственно, терапия с использованием данного слитого белка не является таргетной.

Предложенный авторами настоящего изобретения гибридный белок - тропный к матриксу хряща, за счет того, что содержит лиганд к белку матрицы хряща MATN1. Данный белок также содержит фактор роста из EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, а также трансферрин, либо его фрагмент, а также Fc-фрагмент антитела, либо полипептид, связывающийся с FcRn, для парентерального введения, либо для пероральной доставки.

Компоненты гибридного белка соединены гибкими мостиками, что позволяет достигать функционирования каждого компонента белка.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в увеличении эффективности регенерации хряща за счет нацеливания гибридного белка на матрикс хряща. Таким образом, средство накапливается именно в ткани-мишени - присутствует там в повышенной концентрации, в отличие от препарата, просто циркулирующего в кровотоке. Также в одном из вариантов используют и иные факторы роста - EGF, либо TGF, либо IGF.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) выражается в увеличении безопасности, за счет таргетности его воздействия, что исключает непредвиденные реакции и побочные явления в организме.

Технический результат от использования гибридного белка, либо препарата на его основе по изобретению (вариантов) заключается также в расширении спектра действующих веществ или препаратов, соответственно, для лечения заболеваний хряща, которые могут вводиться парентерально, либо перорально.

Авторами настоящего изобретения также предложено парентеральное введение описанного(ых) выше гибридного(ых) белка(ов), содержащего(их) транспортный домен (трансферрин/фрагмент трансферрина и/или Fc-фрагмент антитела/полипептид, связывающийся с FcRn), совместно с гибридным(и) белком(ами), не содержащими транспортный домен, также в составе препарата для регенерации хряща, в одном из вариантов. В данном случае технический результат совпадает с таковым от использования таких действующих веществ. Такие белки также дольше присутствуют в организме.

Технический результат от использования препарата на основе от 2 гибридных белков, не содержащих транспортный домен, совпадает с таковым от использования таких действующих веществ.

Авторами настоящего изобретения также предложена генетическая конструкция (варианты) для экспрессии в клетках целевого организма (варианты), кодирующая гибридный белок (варианты), включающий лиганд к белку MATN1, фактор роста из EGF, либо TGF, либо FGF, либо IGF, Fc-фрагмент антитела, либо полипептид, связывающийся с FcRn, и/или трансферрин, либо его фрагмент; компоненты соединены гибкими мостиками. Авторы предлагают парентеральное введение данной генетической конструкции, от 1 шт. в препарате, в одном из вариантов - вместе с генетической конструкцией, описанной выше, не содержащей транспортный домен, от 1 шт. в препарате. Такая конструкция, а также препарат на ее основе, в том числе с добавлением указанного(ых) выше дополнительного(ых) компонента(ов) не известны из уровня техники. Преимущества и технический результат - те же, что и кодируемых ею гибридных белков, описанных выше, а также генетической конструкции, описанной выше, не содержащей транспортный домен, и препарата на ее основе.

Таким образом, в настоящее время не известны препараты на основе гибридного(ых) белка(ов), таргетного(ых) к хрящевой ткани, для лечения заболеваний хряща за счет индукции регенерации хрящевой ткани, причем как вводимые парентерально, так и перорально. Также не известны препараты на основе генетической(их) конструкции(й), с которой(ых) в клетках целевого организма синтезируют(ся) такой(ие) гибридный(е) белок(ки), вводимые парентерально.

Соответственно не являются известными и изобретения, используемые для получения выше указанных гибридных белков: полинуклеотиды, генетические конструкции, продуценты; генетических конструкций: полинуклеотиды, продуценты. Технический результат от них заключается в получении белков, генетических конструкций, соответственно, и препаратов по изобретению.

Сущность изобретения

Актуальной задачей настоящего времени является разработка препаратов, которые позволили бы добиться значительной регенерации поврежденной хрящевой ткани, причем которые действовали бы таргетно и были удобными в применении, а также безопасными и экономичными при производстве и применении. Данная задача решена предложенной группой изобретений (вариантами).

Предложена группа изобретений (варианты): (1) гибридный белок, включающий лиганд к белку MATN1, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, и фактор роста из EGF, TGF, FGF, IGF, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 3, либо SEQ ID NO: 4, либо SEQ ID NO: 5, соответственно, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, охарактеризованным последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6; (2) гибридный белок (1), дополнительно содержащий Fc-фрагмент антитела, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7, либо полипептид, связывающийся с FcRn, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 8, и/или трансферрин, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9, либо его фрагмент, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, охарактеризованным последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6; (3) полинуклеотид, кодирующий гибридный белок (1) или (2), кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента, либо таргетного организма, (4) генетическая конструкция для синтеза в клетках продуцента, либо таргетного организма гибридного белка (1) или (2), включающая полинуклеотид (3) и элементы, позволяющие реализовать указанное назначение, (5) продуцент гибридного белка (1) или (2), (6) продуцент генетической конструкции (4) на основе бактериальной клетки, препарат для регенерации хряща, содержащий по меньшей мере один/одну (7) гибридный белок (1) или (2), либо (8) генетическую конструкцию для его/их синтеза в клетках таргетного организма в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор, для парентерального или (9) в случае препарата на основе от одного гибридного белка (2), перорального введения, в последнем случае препарат заключен в энтеросолюбильную оболочку.

Подробное описание изобретения

Предложена группа изобретений: гибридный белок, полинуклеотид, генетическая конструкция, продуцент, препарат для регенерации хряща (варианты).

Предложены гибридные белки, каждый включает лиганд к белку MATN1 и фактор роста из EGF, TGF, FGF, IGF, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, последовательности компонентов приведены на фиг. 1. Также предложены гибридные белки, которые дополнительно содержат от одного компонента из Fc-фрагмент антитела, полипептид, связывающийся с FcRn, трансферрин, либо его фрагмент, компоненты конструкции соединены гибким мостиком, последовательности компонентов приведены на фиг. 1.

Предложены полинуклеотиды, кодирующие описанные гибридные белки, кодонно оптимизированные для экспрессии в клетках продуцента, либо таргетного организма. Таргетный организм - организм, в котором требуется восстановление хряща. При известности аминокислотной последовательности белка специалист в данной области сможет получить нуклеотидную последовательность. Кодонную оптимизацию проводят самостоятельно, используя информацию о частоте встречаемости кодонов у продуцента, например, в базе данных [например, Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):292], либо с использованием специализированных программ, например, представленной на сайте <http://www.emborbio.com/protocols/Codon.htm>, либо http://molbiol.ru/scripts/01_19.html.

Предложены генетические конструкции для экспрессии в клетках продуцента, либо таргетного организма описанных полинуклеотидов; каждая конструкция включает, помимо полинуклеотида, элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.

Под генетической конструкцией для экспрессии в клетках таргетного организма подразумевается "короткая" линейная конструкция, либо рекомбинантный вектор, в кольцевой, либо линейной форме, который может быть представлен плазмидным, либо вирусным вектором.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках продуцента, должна содержать, помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, и эффективного функционирования согласно назначению, а также для селекции трансформанта.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках таргетного организма, рекомбинантный вектор, должна содержать, помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для поддержания и амплификации и эффективного функционирования согласно назначению.

Такие генетические конструкции экономически наиболее выгодно нарабатывать в прокариотических клетках, преимущественно бактериальных клетках. В связи с этим такие генетические конструкции по настоящему изобретению содержат элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, в клетках бактерий. Такими существенными элементами являются прокариотический ориджин репликации, для поддержания в клетке со средней, предпочтительно высокой, копийностью, и ген для возможности селекции штамма-продуцента - ген, обуславливающий устойчивость к антибиотикам, либо ген, завершающий ауксотрофию. Подходящий ориджин репликации для, например, плазмидного вектора представлен, например, pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, SV40, но не ограничивается ими. Также может содержаться элемент для интеграции конструкции в геном продуцента. На-

пример, 3' AOX1 или 18S рРНК для дрожжей.

Под элементами для селекции трансформанта подразумевают, как правило, ген, обуславливающий устойчивость к антибиотику, либо ген, завершающий ауксотрофию. При использовании бактерии в качестве продуцента селективный маркер может быть представлен, например, геном устойчивости к ампициллину, либо канамицину, либо тетрациклину; дрожжей - например, геном LEU2, либо TRP1, либо URA3; грибов, например геном устойчивости к биалафосу, либо гигромицину, либо ауреобасидину, либо блеомицину; растений - например геном устойчивости к канамицину, либо биалафосу; клеток млекопитающих - например, геном устойчивости к неомицину.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках целевого организма, "короткая" линейная конструкция, должна содержать помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для эффективного функционирования согласно назначению. Нарработку такой генетической конструкции экономически наиболее выгодно осуществлять с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Под элементами для эффективного функционирования, для экспрессии закодированного белка, подразумеваются сигналы инициации транскрипции, промотор, сигналы инициации трансляции, стартовый кодон и стоп-кодон(ы), терминирующие транскрипцию последовательности, регуляторные последовательности. Также возможно наличие секреторной последовательности.

При использовании в качестве продуцента организма *Escherichia coli* промотор может быть представлен, например, промотором оперона лактозы, оперона триптофана; дрожжей - например промотором гена кислой фосфатазы, гена алкогольдегидрогеназы, гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гена метаболизма галактозы; грибов - например, промотором гена целлюлозгидролазы, либо α -амилазы, либо глюкоамилазы, либо глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, либо гена *abp1*; растений - например промотором CaMV 19S RNA или CaMV 35S RNA, либо промотором гена нопаинсинтетазы. При использовании в качестве продуцента клеток млекопитающего, например промотор может быть представлен природным промотором со своими регуляторными элементами (например, CaM kinase II, CMV, *nestin*, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, ρ -globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица 1 каинатного рецептора и субъединица B глутаматного рецептора и другие), либо синтетическим с регуляторными последовательностями, для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции.

Сигналы инициации трансляции - последовательность Шайна-Дальгарно [Kapp L. D., Lorsch J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation//Annual Review of Biochemistry 73/2004, 657-704] у прокариот и последовательность Козак у эукариот [Kozak M. (1986) "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes", Cell 44, 283-292]. При использовании клеток млекопитающих последовательность Козака непосредственно перед стартовым кодоном ATG позволяет увеличить экспрессию [Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. EMBO J. 1997; 16(9): 2482-2492].

Терминирующая последовательность является одним из элементов, обуславливающих стабильность мРНК. Терминирующая последовательность для эукариот содержит последовательно стоп-кодон, 3' нетранслируемую область с сигналом и сайтом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет чего сохраняется стабильность мРНК и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра. Терминирующая последовательность представлена нативной, т.е. исходной для кДНК используемого белка, либо иной, более сильной, которая представлена, например, для клеток млекопитающих терминирующей последовательностью бычьего гормона роста (BGH), но ею не ограничивается, и может содержать дополнительный стоп-кодон перед 3' нетранслируемой областью. Пример терминирующей последовательности для клеток растений - таковая гена нопаинсинтетазы (NOS T).

Регуляторные последовательности - нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования генетической конструкции. Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору - это энхансер для увеличения уровня экспрессии через улучшение взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК, инсулятор для модулирования функций энхансера, сайленсеры, либо их фрагменты для снижения уровня транскрипции, например для тканеспецифической экспрессии, 5' нетранслируемая область до промотора, включая интрон. При использовании сайленсера, либо инсулятора в составе конструкции возможно регулировать экспрессию целевого гена.

Генетическая конструкция для синтеза белка в клетках эукариот в одном из вариантов по настоящему изобретению содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта генетической конструкции, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии целевого гена.

Иные регуляторные последовательности: нетранслируемая область downstream от промотора, включая интрон, для повышения стабильности мРНК и увеличения экспрессии целевого гена.

Генетическая конструкция для синтеза белка в клетках эукариот по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит такой регуляторный элемент.

Для секреции гибридных белков по изобретению на N-конец полинуклеотида, кодирующего таргетный ген, помещают сигнальный пептид, подходящий для используемого продуцента, либо таргетного организма. Примеры таких секреторных последовательностей описаны в литературе [например, для *E. coli* - в патенте РФ № 2198179, дата приоритета 15.09.1999, для дрожжей - в патенте РФ № 2143495, дата приоритета 08.07.1994, патенте США № 4546082, дата приоритета 17.06.1982, европейских заявках на изобретение №№ 116201, 123294, 123544, 163529, 123289, заявке на изобретение Дании 3614/83, дата приоритета 08.08.1983, для растений - в статьях Kapila J, Rycke RD, Van Montagu M., Aengen G. (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122: 101-108, Stiefel, V., Ruiz-Avila, L., Raz, R., Valles, M.P., Ghez, J., Pages, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Ludevid, M.D., Langdale, J.A., Nelson, T., and Puigdomènech, P. (1990). Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *Plant Cell* 2,785-793]. Причем может содержаться нативная, либо гетерологичная секреторная последовательность, кодонно оптимизированная для клетки, в которой осуществляется синтез гибридного белка по изобретению. В одном варианте изобретения генетическая конструкция для синтеза гибридного белка в клетках млекопитающих содержит секреторную последовательность TPA (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP000921.1). Преимущество использования секреторной последовательности TPA - в обширном предшествующем клиническом опыте, а также в том, что показана ее высокая производительность в отношении экспрессии секретируемого белка с различных генов-мишеней.

Могут содержаться и иные элементы, требуемые для функционирования экспрессионной системы. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты таких элементов и их использования, генетическая конструкция по настоящему изобретению может содержать любые отвечающие вышеуказанным условиям комбинации, при которых с генетической конструкции осуществляется синтез гибридного гена в клетках продуцента, либо таргетного организма.

Последовательность расположения описанных элементов в генетической конструкции понятна среднему специалисту в данной области.

Генетическая конструкция для экспрессии в клетках продуцента может быть представлена, в зависимости от совместимости с продуцентом, вирусным, плазмидным, фосмидным, космидным или иным возможным вектором. К примеру, при выборе в качестве продуцента клеток *E. coli*, ген может быть в составе бактериофага, например, на основе фага λ , либо плазмиды, например, на основе pBR, либо pUC, и подобное. При использовании в качестве продуцента организма *Bacillus subtilis* ген может быть, например, в составе плазмиды на основе pUB. При использовании в качестве продуцента дрожжей генетическая конструкция может быть представлена, например, плазмидой на основе YEр, либо YRp, либо YCp, либо YIp. При использовании в качестве продуцента клеток млекопитающих, генетическая конструкция может быть представлена, например, плазмидой, например pVAX1, pcDNA3.1, либо аденоассоциированным вирусом, но ими не ограничивается.

Подходящие генетические конструкции для экспрессии в клетках таргетного организма - млекопитающих представлены известными среднему специалисту в данной области и описанными в литературе [Hartikka J., Sawdey M., Comfert-Jensen F., Margalith M., Barnhart K., Nolasco M., Vahlsing HL, Meek J., Marquet M., Hobart P., Norman J., Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 1996 Jun 20;7(10): 1205-17 и др.], а также теми, которые могут быть созданы средним специалистом в данной области с использованием рекомендаций по элементам векторов ["Cloning Vectors", ed. Pouwls et al., Elsevier, Amsterdam- New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018, Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.* 2009 Jul-Aug; 27(4):353-70. doi: 10.1016/j.biotechadv. 2009.02.003. Epub 2009 Feb 20. Review и др.]. Предпочтительными генетическими конструкциями для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, возможно модифицированные для соответствия заявленным критериям, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Однако возможно и использование иных генетических конструкций, содержащих требуемые описанные элементы.

Предложены продуценты описанных гибридных белков, на основе прокариотического, либо эукариотического организма. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, эукариотический продуцент - грибами, клетками растений, млекопитающих.

Предложены продуценты описанных генетических конструкций на основе бактериальной клетки. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Примеры выше приведены для наглядности реализации изобретений (генетическая конструкция, продуцент), но реализация ими не ограничивается. На сегодняшний момент в научной литературе (например, учебники по молекулярной биологии, биотехнологии, статьи, например, доступная по адресу <http://www.labome.ru/method/Recombinant-Protein-Expression-Vector-Host-Systems.html>, специализированные сайты в интернете с базами данных, например, векторов) описано множество экспрессионных систем, а также методик их создания и работы с ними, в связи с чем специалисту понятно, что представленное описание группы изобретений позволяет их осуществить.

Предложены варианты препарата для регенерации хряща. Каждый вариант для парентерального введения содержит не менее одного из описанных гибридных белков, в качестве активного агента, либо не менее одной из описанных генетических конструкций одного вида для синтеза гибридного белка в клетках таргетного организма, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор. В препарате каждый гибридный белок - либо только из двух компонентов, либо, при использовании домена(ов) для перорального введения, только из трех и/или четырех, генетическая конструкция - кодирует один гибридный белок (от 2 до 4 компонентов). Каждый вариант для перорального введения содержит от 1 гибридного белка из 3, либо 4 компонентов, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор. Фармацевтически приемлемые носители или буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. В качестве потребителя препарата может выступать как человек, так и животное, в том числе из домашних или сельскохозяйственных животных. Пероральная форма препарата вводится в составе специальной капсулы, которая растворяется в кишечнике и частично в желудке, - в энтеросолюбивой оболочке. Например, могут использоваться липосомы, как и в случае рекомбинантного перорального препарата Реаферон-Липинт. Также могут содержаться наполнители капсулы, дополнительно снижающие кислотность (карбонаты) и защищающие белок. Взаимодействие с рецепторами происходит быстро, и белок не успевает разрушиться.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованных изобретений и их эффективность. Полученные результаты исследований проиллюстрированы следующими примерами.

Перечень фигур, чертежей и иных материалов

На чертеже компоненты гибридных белков по изобретению: А - лиганд к белку MATN1, В - EGF, С - TGFβ1, D - FGF2, Е - гибкий мостик, F - Fc-фрагмент антитела, G - полипептид, связывающийся с FcRn, H - трансферрин, I - фрагмент трансферрина, J - IGF-1. CEA - пример соединения компонентов в гибридном белке.

Пример 1. Моделирование гибридных белков

Для моделирования белков были произведены следующие действия:

1. Поиск компонентов гибридного белка
2. Построение модели целого белка для определения ориентации доменов
3. Построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и ab initio)
4. Докинг моделей с использованием модели целого белка.

Для получения наиболее реалистичных результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser для моделирования белков.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В/С/Д/Ј, а также таковые, дополнительно содержащие компонент(ы) F/G и/или H/I, компоненты во всех белках соединены гибким мостиком Е, были проанализированы с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>), по аминокислотным последовательностям данных белков. Получены следующие данные.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В, соединенных Е, состоят из 77 а.о., А, С, соединенных Е, - 136 а.о., А, D, соединенных Е, - 147 а.о., А, J, соединенных Е, состоят из 177 а.о., и имеют молекулярную массу 8,4 кДа, pI 5,1, 15 кДа, pI 8.74, 16,3 кДа, pI 9,81, 19,2 кДа, pI 9,46 соответственно.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В, F, соединенных Е, состоят из 316 а.о., А, С, F, соединенных Е, - 375 а.о., А, D, F, соединенных Е, - 386 а.о., А, J, F, соединенных Е, состоят из 416 а.о., и имеют молекулярную массу 34,7 кДа, pI 6,34, 41,3 кДа, pI 8.4, 42,7 кДа, pI 9,1, 45,5 кДа, pI 8,94 соответственно. При добавлении компонента Н с использованием Е белки увеличиваются на 709 а.о., молекулярная масса - на 77,7 кДа. При добавлении вместо компонента Н с использованием Е компонента I с использованием Е белки увеличиваются на 27 а.о., молекулярная масса - на 2,4 кДа.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В, G, соединенных Е, состоят из 126 а.о., А, С, G, соединенных Е, - 185 а.о., А, D, G, соединенных Е, - 196 а.о., А, J, G, соединенных Е, состоят из 226 а.о., и имеют молекулярную массу 13,3 кДа, pI 5,3, 19,9 кДа, pI 8.7, 21,2 кДа, pI 9,65, 24,1 кДа, pI 9,35 соответственно. При добавлении компонента Н с использованием Е белки увеличиваются на 709 а.о., молекулярная масса - на 77,7 кДа. При добавлении вместо компонента Н с использованием Е компонента I с использованием Е белки увеличиваются на 27 а.о., молекулярная масса - на 2,4 кДа.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В, H, соединенных Е, состоят из 786 а.о., А, С, H, соединенных Е, - 845 а.о., А, D, H, соединенных Е, - 856 а.о., А, J, H, соединенных Е, состоят из 886 а.о., и имеют молекулярную массу 86,1 кДа, pI 6,52, 92,6 кДа, pI 7.70, 94 кДа, pI 8,3, 96,9 кДа, pI 8,25 соответственно.

Смоделированные гибридные белки, представленные комбинацией компонентов (фиг. 1) А, В, I, со-

единенных E, состоят из 104 а.о., A, C, I, соединенных E, - 163 а.о., A, D, I, соединенных E, - 174 а.о., A, J, I, соединенных E, состоят из 204 а.о., и имеют молекулярную массу 10,8 кДа, pI 5,83, 17,4 кДа, pI 8.88, 18,7 кДа, pI 9,89, 21,6 кДа, pI 9,55 соответственно.

Основываясь на расчетах указанной выше программы, во всех типах клеток поддерживается оптимальный период полужизни любого из представленных в данном примере белков при наличии на N-конце такого белка метионина. При экспрессии гибридного полинуклеотида (вариантов) в любой клетке синтезируется белок с метионином на N-конце, поскольку трансляция всегда начинается со старт-кодона. Далее метионин может отщепляться, либо естественным путем, например, если белок секретируемый, в составе секреторного пептида, либо его можно отщепить при очистке белка, как, например, в случае с некоторыми белками, получаемыми в клетках *Escherichia coli* и иных бактерий. Таким образом, возможен вариант гибридного белка по изобретению с метионином на N-конце, либо без него.

Пример 2. Получение высокоочищенных гибридных белков согласно изобретению с использованием прокариотического организма

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *E.coli* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в бактериальном экспрессионном векторе pET28a(+) по рестрикционным сайтам, фланкирующим таргетные гены, по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E.coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λ De3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген rne (rne131) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. Ion- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготавливали клетки *E. coli* штамма BL21 с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение ночи в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 с при 5000 об/мин на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на электропораторе Eporator (Eppendorf, Германия) в стерильных кюветах для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм, при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мс.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) в течение 40 мин при +37°C. 10-100 мкл клеточной суспензии высевали на селективную LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую канамицин (100 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Выросшие колонии *E. coli* проверяли на наличие плазмид со вставкой таргетного гена. Клон клеток, содержащих искомую плазмидную ДНК, считали штаммом-продуцентом гибридного белка. Таким образом были получены штаммы-продуценты гибридных белков по изобретению.

Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм. В качестве индуктора использовали 0.2% лактозу (Studier, 2005).

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудьера (Studier, 2005) использовали среду PYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM K₂HPO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы.

В среду PYP-5052, содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 20 ч до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 ч. Отбирали аликвоту клеток на анализ экспрессии гена, кодирующего гибридный белок, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Осажденные клетки лизировали с помощью 3 циклов соникации по 30 с с перерывом в 2 мин на

льду. Затем проводили разрушение телец включения путем инкубации с лизирующим буфером, содержащим 500мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, в течение часа. К клеткам, собранным центрифугированием из 50 мл культуры, добавляли по 8 мл лизирующего буфера.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, анализировали электрофоретически в 12% ПААГ-ДДС-Na, фракции с целевым белком объединяли, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд.

Получили препараты белков чистотой около 97-98%, по данным SDS-PAGE, концентрация гибридного белка в каждом препарате составила 1-2 мг/мл.

Пример 3. Получение высокоочищенных гибридных белков согласно изобретению с использованием эукариотического организма

3.1. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием клеток дрожжей.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области для получения секретируемого белка, по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pHIL-S1 по инструкции к вектору.

Подготавливали клетки дрожжей к трансформации. Провели культивирование и заморозку клеток *Pichia pastoris* штамма SMD1163, дефектного по нескольким протеазам дрожжей, что обеспечивает стабильность секретируемого белка. Клетки высевали в стерильных условиях на агар в среде YPD (1% - дрожжевой экстракт, 2% - пептон, 2% - глюкоза, 1 мМ дитиотреитол), культивировали при 30°C, затем пересеивали в суспензию и культивировали в течение 16 ч. Часть клеток ресуспендировали в YPD среде с добавлением 15% глицерина и замораживали при -86°C. Для получения компетентных клеток предварительно выращивали колонии клеток в чашке с агаром в YPD среде при 30°C в течение двух дней. Затем содержимое одной колонии выращивали в 10 мл YPD среды при 30°C в течение 16 ч. Разбавляли суспензию в YPD до ОП₆₀₀ 0.2 и конечного объема 10 мл и выращивали культуру до ОП₆₀₀ 0-8 в течение 4 ч. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 500 g, выливали супернатант, ресуспендировали в 10 мл раствора I из набора для трансформации EasyComp Transformation Kit, вновь центрифугировали и ресуспендировали осадок в растворе I. Аликвоты компетентных клеток по 50-200 мкл разливали в стерильные пробирки объемом 1.5 мл, которые хранили при температуре -90°C до использования.

Для трансформации использовали набор EasyComp Transformation Kit, входящий в состав *Pichia Easy Select Kit* (Invitrogen), реакцию проводили по инструкции к набору. Полученную суспензию клеток рассеивали в стерильную чашку на агаровый гель, приготовленный на среде YPD с добавлением 1М сорбитола и антибиотика ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Через 3 суток получили несколько десятков колоний на чашку. Клетки из выросших колоний переносили на чашку с MMD (minimal medium dextrose)-агаром и культивировали чашку 2 дня при 30°C.

Клетки выросших на селективной среде колоний переносили в колбы и культивировали в 5 мл среды MGY на качалке (250 об/мин.) в течение 1 суток до ОП₆₀₀ 5. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 g 10 мин. Контроль экспрессии целевого гена осуществляли методом SDS-PAGE.

После осаждения клеток питательную среду фильтровали (диаметр пор 45 мкм), затем добавляли Трис-HCl pH 6.0 до конечной концентрации 20 мМ. Среду культивирования, содержащую гибридный белок, концентрировали в 5-10 раз, используя концентраторы для белков с молекулярной массой более 10 кДа фирмы "Millipore".

После концентрирования препарат гибридного белка нагревали на водяной бане до кипения (t=100°C) и кипятили 2 мин, после чего центрифугировали при 4°C, 15000×g 15 мин.

Проводили ионообменную хроматографию на КМ-сефарозе. Колонку с КМ-сефарозой уравнивали буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl pH 6.0. Препарат гибридного белка наносили со скоростью 60 мл/ч. Колонку промывали 20 мМ Трис-HCl pH 6.0; 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 200 мМ NaCl. Элюцию проводили 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 1 М NaCl и собирали фракции по 1 мл.

Препарат полученного гибридного белка разбавляли в 2 раза, добавляли фосфат pH 8.0 до концентрации 50 мМ и наносили на колонку. После промывки колонки буфером нанесения балластные белки удаляли промывкой раствором 20 мМ имидазола в том же буфере. Белок элюировали раствором, содержащим 200 мМ имидазола.

В результате были получены препараты гибридных белков с чистотой свыше 95%. Выявлено наличие на электрофореграммах полос, соответствующих по молекулярной массе целевым белкам. Для полученных штаммов характерен высокий уровень экспрессии таргетных белков.

3.2. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием клеток млекопитающих.

На N-конце аминокислотной последовательности каждого гибридного белка поместили сигнальную последовательность TPA (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1). Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках млекопитающих (CHO) в ручном режиме и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции и последовательность Козака. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Клонировали синтезированный ген в векторе pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору. На основе клеток *E.coli* DH10 B/R был создан штамм-продуцент данной плазмидной ДНК, по описанному в п.4.1.1. протоколу.

Трансфекцию клеток млекопитающих созданными плазмидами проводили методом кальций-фосфатного осаждения.

Для проведения трансформации клеток млекопитающих (CHO) плазмидными ДНК клетки высевали в 12-луночные планшеты (Costar, США) с плотностью посева 5×10^4 кл/см². На следующий день для синхронизации клеточных делений культуральную среду заменяли. Через 3 ч к клеткам добавляли плазмидную ДНК, осажденную фосфатом кальция. Для приготовления осадка 250 мкл раствора, содержащего 50 мкг ДНК в 250 мМ CaCl₂, медленно смешивали с 250 мкл раствора (1,64% NaCl, 1,13% HEPES pH 7,12 и 0,04% Na₂HPO₄). После 24 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ среду заменяли на аналогичную, содержащую 100 мкг/мл неомидина для селекции клонов, содержащих плазмиды со вставкой таргетного гена и, следовательно, экспрессирующих гибридные белки, селекцию проводили в течение 20 суток, в лунках, содержащих живые клетки, меняли среду (при этом предыдущую культуральную среду не выливали, а использовали для определения количества секретируемых белков методом ИФА), а еще через сутки клетки снимали с подложки и проводили анализ на экспрессию трансформированных генов. Анализ эффективности трансфекции проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL Beckman Coulter (Beckman Coulter, США).

Уровень гибридных белков в культуральной среде полученных стабильных трансфектом линии CHO оценивали с использованием стандартного твердофазного ИФА.

В результате клонирований были получены стабильные трансфектомы CHO, которые накапливали для криоконсервирования и наработки опытной партии гибридных белков. Продуктивность созданных трансфектом CHO, экспрессирующих гибридные белки, составила 420-540 мкг/10⁷ клеток/день.

Культивирование клеток-продуцентов осуществляли с использованием биореактора BIOSTAT® Bplus и автоклавируемой среды IMDM с добавлением 45 г DFBS (0,5%) и 25,8 г (100 мМ) сульфата цинка семиводного (ZnSO₄ × 7H₂O) на 9 л среды. Задавали рабочий режим: температура 37°C, pH 6,9-7,2, концентрация кислорода 50% насыщения воздуха. После достижения заданного режима производили засев биореактора, для чего в асептических условиях в него вводили посевной материал. Время культивирования составляло 3 суток.

По окончании культивирования культуральную жидкость фильтровали через стерильную капсулу "Sartopure" ("Sartorius", Германия), с диаметром пор 1,2 мкм, со скоростью 1 л/мин. Затем осветленную жидкость концентрировали на системе Viva Flow 200 ("Sartorius", Германия) с использованием фильтра. Концентрирование проводили до достижения общего объема - 200 мл.

Хроматографическую очистку проводили в два этапа, с использованием стерильных растворов. На первом этапе использовали систему BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad) с автоматическим коллектором фракций BioFract и полупрепаративную хроматографическую колонку YMC TriArt, 250×4,6 мм, сорбент C18. Перед началом работы колонку уравнивали с помощью 200 мл буфера (1 кг воды для инъекций и 1 г кислоты трифторуксусной) в ручном режиме через насос хроматографа на скорости 2 мл/мин.

Подготовленный материал в объеме 200 мл вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (2 кг ацетонитрила, 2 г кислоты трифторуксусной) со скоростью 0,5 мл в минуту. Собирали фракцию в максимуме поглощения при 260 нм. Объем фракции составил примерно 500 мл.

Второй этап очистки выполняли с использованием гель-хроматографической колонки BioSil SEC 125-5, 300×7,8 мм. Предварительно колонку уравнивали 0,02 М PBS-буфером. Полученный материал вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (0,6 М раствор NaCl) с градиентом концентрации от 0,1 до 0,6 М. Собирали фракцию, имеющую поглощение при A280 нм не менее 3.4 оптических единиц. Фракцию собирали во флаконы. Объем получаемого раствора для каждого препарата белка составил примерно 1 л с концентрацией гибридного белка 2-2,7 мг на 1 мл.

Гибридные белки согласно изобретению возможно получить с использованием также других клеток

млекопитающих, например HEK293, COS.

3.3. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием растений.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *Nicotiana benthamiana* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически и клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pTRV1. Возможно использовать и вирусный вектор (например, описанный в статье Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С., Шварц А.М., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2006) Новый вирус-вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. Биохимия, 71(8), 1043-1049).

Полученный вектор вводили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, который использовали для инфильтрации листьев *N. benthamiana*. Полученный штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий гибридный ген, культивировали в течение 12 ч при 30°C в шейкере. Клетки (1,5 мл) осаждали центрифугированием (4000g, 5 мин), осадок ресуспендировали в буфере (1,5 мл: 10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.5)), ОП₆₀₀ доводили до 0,2. Наносили суспензию агробактерий шприцом без иглы на листья растущих растений *N. benthamiana*. Наблюдали максимальный уровень синтеза белков на 7-11 сутки после инфильтрации.

Экспрессию гибридных белков в клетках листьев растений-продуцентов анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с ДДС Na. Фрагмент листа растирали в буфере (10 mM KCl, 50 mM Трис pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-меркаптотанол, 0.4 M сахара, 10% глицерин) на 10 день после заражения. Полученный экстракт подвергали центрифугированию (14000g, 10 мин), осадок и супернатант анализировали с использованием SDS-ПААГ. На электрофореграмме выявлены белки, соответствующие по молекулярному весу гибридным белкам согласно изобретению, в мембранной фракции клеток. В контроле, растениях, которые не подвергались трансформации, соответствующие белки не выявлены. Выход белков составлял около 12-14% фракции нерастворимых белков.

Исходя из полученных результатов, заявляемые гибридные белки возможно получить с использованием и прокариотических, и эукариотических клеточных систем, высокоочищенный препарат каждого белка можно получить с использованием различных типов очистки белка. Приведенные условия выделения и очистки подбирались экспериментальным путем и могут варьировать в известных среднему специалисту в этой области значениях.

Пример 4. Получение высокоочищенных генетических конструкций согласно изобретению

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках млекопитающих с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции и последовательность Козака. Синтезировали рассчитанные гены химически.

4.1. Получение плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок по изобретению (варианты)

4.1.1. Создание штамма-продуцента плазмидной ДНК

Полученные гены помещали в эукариотические экспрессионные вектора pVAX1 (Invitrogen), либо pcDNA3.1+ (Invitrogen) по рестрикционным сайтам, фланкирующим таргетные гены, по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E. coli* штамма DH10B/R (F-mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM 15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu)769, galU, galK⁻, rpsL, purG) полученными плазмидными ДНК методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). Данный штамм не содержит метилазу, что позволяет минимизировать возможность возникновения мутаций в ДНК, в том числе в клонированном в плазмиде, поддерживаемой в данном штамме, гене. К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл диализованной лигазной смеси, помещали между электродами порационной ячейки и обрабатывали импульсом тока.

После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при +37°C.

Проводили выявление клонов клеток *E. coli*, содержащих полученную плазмидную ДНК, на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл канамицина, либо ампициллина соответственно.

Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования.

Секвенирование клонированных фрагментов проводили по методу Сэнджера с использованием набора Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по прилагающейся к нему инструкции. Для мечения продуктов реакции использовали меченные флуоресцентным красителем ddNTP, причем каждому ddNTP соответствовал свой краситель. Для секвенирования использовали немеченные специфические для плазмид праймеры. Проводили ПЦР-реакцию, затем реакционную смесь очищали от свободных меченых ddNTP по инструкции к набору BigDye X-

Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) и разделяли продукты реакции секвенирования с использованием капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и реактива 3500/3500xL Genetic Analyzer Polymer "POP-6™" (Applied Biosystems, США).

Результаты разделения продуктов реакции секвенирования регистрировались путем сканирования лазером и детекции четырех флуоресцентных красителей, включенных во все типы ddNTP.

Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Chromas и BioEdit. Нуклеотидные последовательности исследованных фрагментов ДНК были выровнены относительно рассчитанных, была продемонстрирована идентичность синтезированных фрагментов рассчитанным. В результате были отобраны клоны клеток *E.coli*, содержащие полноразмерные последовательности таргетных генов в составе плазмид последовательности ДНК, кодирующие гибридные белки.

4.1.2. Нарabотка плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок (варианты)

Отдельную колонию *E.coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина, либо ампициллина, помещали в 10 мл селективной среды. Клетки растили в течение 12 ч. при +37°C в условиях постоянного перемешивания (250 об/мин). Полученные клетки собирали центрифугированием при 4000g. Дальнейшее выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле, измеряли ее концентрацию с помощью флуориметрии. Выход плазмидной ДНК составил от 3,1 мг до 4,7 мг из 1 л питательной среды.

4.2. Получение вектора на основе аденоассоциированного вируса, кодирующего гибридный белок по изобретению (варианты)

Полученные гены помещали в вектор на основе аденоассоциированного вируса pAAVK-EF1 α -MCS (System Biosciences (SBI)), на основе которого создавали штамм-продуцент данного вектора, используя клетки *E.coli* (RecA⁻), далее выделяли вектор для использования у млекопитающих, все по инструкции к вектору. Выход вектора составил от 2 до 3,2 мг из 1 л питательной среды.

4.3. Получение короткой линейной конструкции, кодирующей гибридный белок по изобретению (варианты)

Для наработки короткой линейной конструкции использовали полученную по п.4.1. плазмидную ДНК. С использованием специфичных праймеров и ПЦР амплифицировали фрагмент плазмидной ДНК, содержащий сигналы инициации транскрипции, промотор, сигналы инициации трансляции, старт-кодон, гибридный ген, 1 или 2 стоп-кодона, терминирующие транскрипцию последовательности, регуляторные последовательности.

Амплификацию указанной последовательности проводили в объеме 50 мкл, в тонкостенных полипропиленовых пробирках объемом 650 мкл, содержащих 5 мкл 10-кратного буфера Taq (700 mM Трис-HCl, pH 8.6/ 25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄), 5 мкл MgCl₂ (1.25 mM), 1 мкл дНТФ, 31,5 мкл воды, 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров, 5 мкл плазмидной ДНК и 0,5 мкл полимеразы Taq (Fermentas, Литва).

Реакционную смесь прогревали 5 мин при 95°C для денатурации ДНК. Для предотвращения испарения на реакционную смесь объемом 50 мкл наслаивали 30 мкл минерального масла Bayol F (Sigma, США). Реакцию амплификации проводили в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Проводили 35 циклов: 95°C - 20 с, 50-62°C (в зависимости от праймеров) - 20 с, 72°C - 1 мин. Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводили дополнительный цикл: 5 мин при 72°C.

Результат ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле. При положительном результате проводили препаративный электрофорез.

Амплифицированные фрагменты ДНК концентрировали и очищали при помощи препаративного электрофореза в 1,2% агарозном геле (Gibco BRL, США). Пробу смеси после проведения ПЦР смешивали с шестикратным буфером (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин) (ThermoScientific, США) и наносили на гель, по 18 мкл в лунку. Электрофорез проводили в горизонтальном аппарате в буфере TAE (40 мМТрис-ацетат, 2 мМ ЭДТА pH 8,0, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при напряжении 5-10 В/см. Результат разделения ДНК регистрировали в проходящем УФ-свете (302 нм) трансиллюминатора Macrovue (LKB, Швеция). Длину амплифицированного фрагмента определяли по логарифмической зависимости подвижности ДНК от длины фрагментов в маркере. В качестве маркеров использовали фирменную смесь фрагментов ДНК "GeneRuler 1000 bp DNA Ladder"(Fermentas, Литва). Участок агарозы, содержащий полосу ДНК необходимого размера, вырезали, и фрагмент ДНК очищали с помощью набора DNA&Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Великобритания) в соответствии с инструкцией. Использовали выделенную короткую линейную конструкцию у млекопитающих.

Пример 5. Выявление регенераторного эффекта гибридных белков по изобретению

Коллаген-индуцированный артрит крыс является моделью ревматоидного артрита человека. Данный тип артрита у крыс вызывали введением нативного гетерологичного коллагена II типа цыплячьего в составе неполного адьюванта Фрейнда. Мишенью для такой аутоиммунной атаки является коллаген II типа. При коллаген-индуцированном артрите ведущая роль в реализации эффекторных реакций принад-

лежит аутоантителам к коллагену (подробное описание моделей: Kleinau S., 1991, Громыко, Грицук, 2012 г.).

Исследовали гибридные белки по изобретению, при введении одного белка и при введении смеси белков, при пероральном введении, а также при парентеральном введении. Результаты оценивали, анализируя гистологические срезы суставов, микроскопией.

5.1. Исследование регенераторного потенциала препарата на основе от одного гибридного белка (варианты) при парентеральном введении

5.1.1. Введение в околосуставные ткани

После формирования артрита крысам вводили гибридный белок (варианты), на основе компонентов А, В/С/Д/Е, и в некоторых вариантах дополнительно F/G и/или H/I, компоненты в вариантах белка представлены в разной очередности и соединены компонентом Е, все компоненты приведены на фиг. 1, либо смесь на их основе, в количестве 20 мкг белка локально - в околосуставные ткани, преимущественно в мышцы, что соответствует дозе для человека 0,1 мг. Введение осуществляли ежедневно в течение семи дней. Начиная с 6 дня, анализировали морфологию суставов в течение 21 дня. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор. Получили достоверную картину восстановления хряща при использовании всех исследуемых гибридных белков, по сравнению с контролем, при этом наилучшие показатели среди групп с введением одного гибридного белка наблюдали в группе АЕJ, групп с введением от двух гибридных белков - в группе АЕJ+JEA, с небольшим отрывом - в группе АЕС+АЕВ+ДЕА+АЕJ, компоненты приведены на фиг. 1. Гибридные белки, дополнительно содержащие компонент(ы) из F/G и/или H/I, в основном, оказывали действие, сравнимое с таковым белков аналогичной структуры, не содержащих данных доменов, то есть вызывали регенерацию поврежденного хряща, более слабо выраженное в случае содержания двух дополнительных доменов.

5.1.2. Системное введение

После формирования артрита крысам вводили гибридный белок (варианты) на основе компонентов А, В/С/Д/Е, и в некоторых вариантах дополнительно F/G и/или H/I, компоненты в вариантах белка представлены в разной очередности и соединены компонентом Е, все компоненты приведены на фиг. 1, либо смесь на их основе, в количестве 20-30 мкг белка системно - в хвостовую вену, что соответствует дозе для человека 0,2-0,3 мг. Введение осуществляли ежедневно в течение семи дней. Начиная с 6 дня, анализировали морфологию суставов в течение 21 дня. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор. Получили достоверную картину восстановления хряща при использовании всех исследуемых гибридных белков, по сравнению с контролем, при этом наилучшие показатели среди групп с введением одного гибридного белка наблюдали в группе JEA, групп с введением от двух гибридных белков - в группе СЕА с метионином на N-конце белка (без формулы)+JEA, с небольшим отрывом - в группе СЕА+ВЕА+JEA, компоненты приведены на фиг. 1. При использовании гибридных белков, содержащих дополнительно компонент(ы) из F/G и/или H/I, наблюдали немного менее выраженную регенерацию хрящей в результате эксперимента, однако после окончания эксперимента наблюдали более длительную циркуляцию данных белков в организме, что возможно обусловило продолжение их действия на восстановительные процессы в хряще.

Наблюдали менее выраженную регенерацию хрящей в результате данного опыта, по сравнению с таковой в опыте, описанном в п.5.1.1.

5.2. Исследование регенераторного потенциала препарата на основе от одной генетической конструкции (варианты) при парентеральном введении

5.2.1. Введение в околосуставные ткани

После формирования артрита крысам вводили от 1 из созданных генетических конструкций на основе плазмидной ДНК, либо аденоассоциированного вируса, либо линейного фрагмента, с которых в клетках животных синтезировался гибридный белок на основе компонентов А, В/С/Д/Е, и в некоторых вариантах дополнительно F/G и/или H/I, компоненты в вариантах белка представлены в разной очередности и соединены компонентом Е, все компоненты приведены на фиг. 1, в количестве 50 мкг ДНК локально - в околосуставные ткани, преимущественно в мышцы, что соответствует дозе для человека 1 мг. Введение осуществляли один раз в семь дней, всего пять раз. После третьего укола анализировали морфологию суставов, в течение 21 дня. В качестве отрицательного контроля использовали ту же генетическую конструкцию, не содержащую гибридный ген. Получили достоверную картину восстановления хряща при использовании всех исследуемых генетических конструкций (ДНК), по сравнению с контролем, при этом наилучшие показатели среди групп с введением одной генетической конструкции наблюдали в группах на основе плазмидной ДНК pVAX, кодирующей гибридный белок АЕJ, а также на основе линейной конструкции, кодирующей гибридный белок АЕDEF, с небольшим отрывом - в группе на основе аденоассоциированного вируса, кодирующего белок FЕBEA, групп с введением от двух генетических конструкций - в группе на основе плазмидной ДНК pcDNA3.1, кодирующей гибридные белки АЕJ+JEA(ген с сигналом секреции на N-конце), с небольшим отрывом - в группе на основе плазмидной ДНК pVAX, кодирующей гибридные белки АЕС+АЕВ+ДЕА+JEA, компоненты приведены на фиг. 1. Генетические конструкции, кодирующие гибридные белки, дополнительно содержащие вышеуказанный четвертый компонент, в основном, оказывали действие, сравнимое с таковым белков аналогичной струк-

туры, не содержащих данных доменов, то есть вызывали регенерацию поврежденного хряща, но более слабо выраженное. Выявлено также, что синтезируемые гибридные белки дольше детектировались в сыворотке животных после окончания эксперимента при введении генетических конструкций, кодирующих один транспортный домен из F/G/H/I. В результате введения линейаризованного вектора наблюдали немного более низкие показатели регенерации.

5.2.2. Системное введение

После формирования артрита крысам вводили созданные генетические конструкции на основе плазмидной ДНК, либо аденоассоциированного вируса, либо линейного фрагмента, с которых в клетках животных синтезировался гибридный белок на основе компонентов А, В/С/Д/Ј, и в некоторых вариантах дополнительно F/G и/или H/I, компоненты в вариантах белка представлены в разной очередности и соединены компонентом Е, все компоненты приведены на фиг. 1, либо смесь на основе таких генетических конструкций, в количестве 50 мкг генетической конструкции системно - в хвостовую вену, что соответствует дозе для человека 1 мг. Введение осуществляли один раз в семь дней, всего пять раз. После третьего укола анализировали морфологию суставов в течение 21 дня. В качестве отрицательного контроля использовали ту же генетическую конструкцию, не содержащую гибридный ген. Получили достоверную картину восстановления хряща при использовании всех исследуемых генетических конструкций по сравнению с контролем, при этом наилучшие показатели среди групп с введением одной генетической конструкции наблюдали в группах на основе аденоассоциированного вируса, кодирующего белок ЈЕА, групп с введением от двух генетических конструкций - в группе на основе плазмидных ДНК, кодирующих белки СЕА+ЈЕА, с небольшим отрывом - в группе на основе линейных фрагментов, кодирующих белки СЕА+ВЕА(с сигнальной последовательностью на N-конце)+ЈЕА, компоненты приведены на фиг. 1. Наблюдали немного менее выраженную регенерацию хрящей в результате данного опыта по сравнению с таковой в опыте, описанном в п.5.2.1..

Генетические конструкции, кодирующие гибридные белки, дополнительно содержащие компонент(ы) F/G и/или H/I, оказывали действие, сравнимое с таковым белков аналогичной структуры, не содержащих данных доменов, то есть вызывали регенерацию поврежденного хряща, однако синтезируемые гибридные белки дольше детектировались в сыворотке животных после окончания эксперимента.

5.3. Исследование регенераторного потенциала препарата на основе от одного гибридного белка (варианты) при пероральном введении

Гибридный белок (варианты), представленный компонентами А, В/С/Д/Ј, F/G и/или H/I, в разной очередности, соединенными компонентом Е, компоненты приведены на фиг. 1, либо смесь на основе таких гибридных белков, помещали в энтеросолюбильное покрытие и вводили крысам после формирования артрита в количестве 2-3 мг белка перорально, что соответствует дозе для человека 20-30 мг. Введение осуществляли ежедневно в течение 7-30 дней. Начиная с 10 дня, анализировали морфологию суставов в течение 21 дня. В качестве отрицательного контроля использовали воду. В качестве положительного контроля использовали препарат хондроитина сульфата, вводили 4 мг, что соответствует дозе для человека 750 мг, 2 раза в сутки в течение 3 недель.

Получили достоверную картину восстановления хряща при использовании всех исследуемых гибридных белков, по сравнению с контролем, при этом наилучшие показатели среди групп с введением одного гибридного белка наблюдали в группах GEAEB/C/D/J, GEB/C/D/JEA, групп с введением от двух гибридных белков - в группе IEJEA+AEVEN, компоненты приведены на фиг. 1. Выявлено, что при использовании совместно с трехкомпонентным, либо четырехкомпонентным (включающими транспортный домен) двухкомпонентного гибридного белка (не включающего транспортный домен) разница в результатах незначительная, по сравнению с введением белка из трех, либо четырех компонентов.

Наблюдали регенерацию хрящей в результате данного опыта, сравнимую с таковой, наблюдаемой в опыте 5.1.1. Кроме того, наблюдали длительное циркулирование гибридных белков, содержащих транспортный домен, в крови. Использование того или иного энтеросолюбильного покрытия не сильно влияло на результаты исследования.

Также провели аналогичное исследование на кроликах, которым осуществляли хирургический разрыв менисков. Результаты данного исследования коррелируют с результатами, полученными в исследовании на модели коллаген-индуцированного артрита крыс.

Таким образом, доказана возможность получения гибридных белков, полинуклеотидов, генетических конструкций, продуцентов, препаратов для регенерации хряща (все варианты). Также показано, что разработанные гибридные белки достоверно обладают регенераторным действием на поврежденный хрящ, как непосредственно вводимые, так и при введении генетических конструкций, их кодирующих. Во всех проведенных исследованиях наблюдали увеличение количества хондроцитов в ранее поврежденных суставах, что, скорее всего, и вызвало регенерацию хряща. Это позволяет сделать вывод о том, что и при иных типах повреждения хрящей предложенное изобретение (варианты) позволит осуществить их регенерацию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок, включающий лиганд к белку MATN1, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, и фактор роста из EGF, TGF, FGF, IGF, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 3, либо SEQ ID NO: 4, либо SEQ ID NO: 5 соответственно; компоненты конструкции соединены гибким мостиком, охарактеризованным последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6.

2. Гибридный белок, включающий лиганд к белку MATN1, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, фактор роста из EGF, TGF, FGF, IGF, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 3, либо SEQ ID NO: 4, либо SEQ ID NO: 5 соответственно, а также Fc-фрагмент антитела, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7, либо полипептид, связывающийся с FcRn, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 8, и/или трансферрин, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9, либо его фрагмент, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10; компоненты конструкции соединены гибкими мостиками, охарактеризованными последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6.

3. Полинуклеотид, кодирующий гибридный белок по п.1 либо 2, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента либо таргетного организма.

4. Генетическая конструкция для синтеза в клетках продуцента либо таргетного организма гибридного белка по п.1 либо 2, включающая полинуклеотид по п.3 и элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.

5. Продуцент гибридного белка по п.1 либо 2.

6. Продуцент генетической конструкции по п.4 на основе бактериальной клетки.

7. Препарат для регенерации хряща, содержащий по меньшей мере один гибридный белок по п.1 и/или 2 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор для парентерального введения.

8. Препарат для регенерации хряща, содержащий по меньшей мере одну генетическую конструкцию для синтеза в клетках таргетного организма по п.4 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор для парентерального введения.

9. Препарат для регенерации хряща, содержащий по меньшей мере один гибридный белок по п.2 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор для перорального введения, препарат заключен в энтеросолюбильную оболочку.

A – DWRVIIPRPSA

B – NSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGIGERCQYRDLKWWEELR
C – ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQA LEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

D – KRLYCKNGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVSISIKGVCANRYLAM
KEDGRLLASKCVTDECFFERLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQG
KAILFLPMS

J – MGKISLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAEL
VDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAS
ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

E – GGGSGGGSGGG

F – DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

G – VDAKYAKEIRWLPNLDPSQSSELLAEAKKLNDSSQAPK

H – RLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFDRDHMKSVIPSDGPS
VA CVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTF
YYAVAVVKKDSGFMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVAN
FFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVKHSTIF
ENLANKADRQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIWELLN
QAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNL
REGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGE
ADAMSLDGGFVYIAGKCGLPVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKASADLTWD
NLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDSLSCKLCMG
SGLNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPAWAKNLNEK
DYELLCLDGTTRKPVVEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDG
SGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVKA VGNLRKCSTSSLEAC
TFRRP

I – THRPPMWSPVWPGGG

CEA – ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSL
DT QYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
GGSGGGGGGGSDWRVIIPRPSA

