

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038520**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.09.09**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)  
**C12Q 1/60** (2006.01)  
**G01N 33/92** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201792418**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.05.06**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО СЛИТОГО БЕЛКА CD24 ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЕЙ ХОЛЕСТЕРИНА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ**

---

**(31)** **62/158,157**

**(56)** US-A1-20010029248

**(32)** **2015.05.07**

US-A1-20110142913

**(33)** **US**

US-A1-20130136739

**(43)** **2018.02.28**

US-A1-20110002846

**(86)** **PCT/US2016/031109**

**(87)** **WO 2016/179456 2016.11.10**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОНКОИММЬЮН, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лю Ян, Чжэн Пань (US)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к способу снижения уровня липопротеинов низкой плотности LDL-C у субъекта, включающему введение гуманизованного слитого белка CD24 нуждающемуся в этом субъекту, где указанный белок содержит (i) полипептид зрелого CD24 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2; и (ii) область Fc белка Ig млекопитающего, где область Fc слита с С-концом белка CD24. Изобретение также относится к способу лечения или предупреждения атеросклероза у субъекта и снижения риска атеросклеротического заболевания сердечно-сосудистой системы у субъекта, включающему введение указанного белка CD24. В изобретении также предложен способ определения активности гуманизованного слитого белка CD24 у субъекта, который проходит лечение указанным белком CD24.

**B1**

**038520**

**038520**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к применению белка CD24 для снижения уровней холестерина липопротеинов низкой плотности.

#### Предшествующий уровень техники

Дислипидемия, включая высокие уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL) (LDL-C), представляет собой основной фактор риска для атеросклероза сердечно-сосудистой системы (ASCVD), который является ведущей причиной смерти и основных затрат на здравоохранение во всем мире. Связь между LDL-C и риском ASCVD была установлена за десятилетия проведения генетических и биохимических исследований, эпидемиологических исследований методом наблюдения и экологических исследований, и *in vitro* и экспериментов на животных. Снижение уровней LDL-C уменьшает количество событий ASCVD, указывая на то, что LDL-C играет центральную, причинную роль в коронарном заболевании сердца (CHD) и ASCVD. Соответственно, фиксированные дозы лекарственных средств, снижающих уровень холестерина, используются в качестве основного подхода снижения риска ASCVD. В частности, повышенный уровень LDL-C наиболее часто лечат статинами (ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент-А редуктазы). Статины снижают LDL-C вплоть до 50% относительно исходного уровня и снижают риск ASCVD на 15-37%.

Однако же остаются оставшиеся 60-80% риска ASCVD, которые вызывают основные сосудистые события у примерно 20% пациентов с CHD, даже при оптимальном лечении статинами. Кроме того, статины могут вызывать симптомы в мышцах, такие как боль, болезненная чувствительность, скованность, судорога, слабость, вялость, миопатия и рабдомиолиз. Кроме того, несмотря на то, что нестатиновые агенты, включая смолы, связывающие жёлчную кислоту, фибраты, ниацин и эзетимиб, значительно улучшают липидные профили, ни один из них не приводит к дополнительному снижению риска сердечно-сосудистых событий при объединении со статином. Соответственно, существует потребность в улучшенных нестатиновых лекарственных средствах для снижения уровней LDL-C и снижения риска ASCVD.

#### Краткое описание изобретения

В данном документе предложен способ снижения уровней LDL-C у субъекта посредством введения белка CD24 нуждающемуся в этом субъекту. Также предложен способ лечения или предупреждения атеросклероза у субъекта посредством введения белка CD24 нуждающемуся в этом субъекту. Кроме того, предложен способ снижения риска сердечно-сосудистого заболевания, которое может представлять собой атеросклероз сердечно-сосудистой системы, посредством введения белка CD24 нуждающемуся в этом субъекту. Субъект может иметь повышенный уровень LDL-C, который может быть выше чем или равным 70, 75 или 190 мг/дл. Субъект возможно ранее проходил лечение другим лекарственным средством, снижающим уровень LDL-C, которое может представлять собой статин или антагонист PCSK9 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9).

Белок CD24 может содержать последовательность зрелого CD24 человека или его варианта. Зрелый CD24 человека может содержать последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. Белок CD24 может содержать любой или все из внеклеточных доменов CD24 человека. Белок CD24 может содержать сигнальную последовательность, которая может делать возможной секрецию из клетки, экспрессирующей данный белок. Последовательность сигнального пептида может содержать сигнальный пептид CD24 человека, который может иметь SEQ ID NO: 4, или может представлять собой последовательность, которая обнаружена на других трансмембранных или секретируемых белках, или последовательность, модифицированную на основе существующих сигнальных пептидов, известных в данной области. Белок CD24 может быть растворимым и может быть гликозилированным. Белок CD24 может быть получен, используя эукариотическую белок-экспрессирующую систему, которая может содержать вектор, содержащийся в линии клеток яичника китайского хомяка, или ретровирусный вектор с дефектом репликации. Ретровирусный вектор с дефектом репликации может быть стабильно интегрирован в геном эукариотической клетки.

Белок CD24 может содержать белковую метку, которая может быть слита на N- и C-конце белка CD24. Белок CD24 может содержать часть белка иммуноглобулина (Ig) млекопитающего, который может представлять собой человека. Часть белка Ig может представлять собой область Fc. Область Fc может содержать шарнирную область, домены CH2 и CH3 белка Ig, и белок Ig может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA. Область Fc может также содержать шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM. Белок CD24 может содержать последовательность SEQ ID NO: 5, 6, 8, 9, 11 или 12.

Также в данном документе предложен способ контроля активности белка CD24 у субъекта. Способ может включать сравнение количества LDL-C в образце крови, полученном от субъекта в момент времени после введения белка CD24 субъекту, с количеством LDL-C в образце крови, полученном от субъекта перед данным моментом времени. Уменьшение количества LDL-C со временем может быть признаком повышения активности белка CD24. Способ может дополнительно включать измерение количества LDL-C в образце крови, полученном после введения белка CD24 субъекту. Способ может также включать измерение количества LDL-C в образце крови, полученном у субъекта перед данным моментом времени. Количество белка CD24, впоследствии вводимое субъекту, можно регулировать в соответствии с количеством LDL-C в образце, полученном после введения белка CD24 субъекту. Количество белка CD24 в по-

следующем введении можно регулировать для поддержания удельной активности уровня концентрации белка CD24 у субъекта.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А показан аминокислотный состав полноразмерного слитого белка CD24, CD24Fc (также называемого в данном документе CD24Ig) (SEQ ID NO: 5). Подчеркнутые 26 аминокислот представляют собой сигнальный пептид CD24 (SEQ ID NO: 4), которые отщепляются во время секреции из клетки, экспрессирующей данный белок, и, таким образом, отсутствуют в процессированной версии белка (SEQ ID NO: 6). Выделенный жирным шрифтом фрагмент последовательности представляет собой внеклеточный домен зрелого белка CD24, используемый в слитом белке (SEQ ID NO: 2). Последняя аминокислота (А или V), которая обычно присутствует в зрелом белке CD24, была удалена из конструкции для того, чтобы избежать иммуногенности. Неподчеркнутые, не выделенные жирным шрифтом буквы представляют собой последовательность Fc IgG1, включая шарнирную область и домены CH2 и CH3 (SEQ ID NO: 7). На фиг. 1Б показана последовательность CD24<sup>V</sup>Fc (SEQ ID NO: 8), в которой зрелый белок CD24 человека (выделено жирным шрифтом) представляет собой полиморфный по валину вариант SEQ ID NO: 1. На фиг. 1В показана последовательность CD24<sup>A</sup>Fc (SEQ ID NO: 9), в которой зрелый белок CD24 человека (выделено жирным шрифтом) представляет собой полиморфный по аланину вариант SEQ ID NO: 1. Разные части слитого белка на фиг. 1Б и 1В отмечены как на фиг. 1А, и альтернативная аминокислота валин/аланин дважды подчеркнута.

На фиг. 2 показан способ очистки и обработки белка CD24, экспрессируемого в линиях клеток млекопитающих.

На фиг. 3 показаны вариации аминокислотных последовательностей у зрелых белков CD24 из мыши (SEQ ID NO: 3) и человека (SEQ ID NO: 1). Потенциальные сайты O-гликозилирования выделены жирным шрифтом, а сайты N-гликозилирования подчеркнуты.

На фиг. 4А-В показан компартментный анализ моделирования WinNonlin фармакокинетики CD24Fc (CD24Ig) у мышей. Незаштрихованные кружки представляют среднее от 3 мышей, и линия представляет собой прогнозируемую фармакокинетическую кривую. Фиг. 4А - внутривенная инъекция 1 мг CD24Fc. Фиг. 4Б - подкожная инъекция 1 мг CD24Fc. Фиг. 4В - сравнение общих количеств антитела в крови, как измерено посредством площади под кривой (AUC), времени полужизни и максимальной концентрации в крови. Следует отметить, что AUC и  $C_{max}$  данной подкожной инъекции составляет примерно 80% от внутривенной инъекции, хотя различие не является статистически значимым.

На фиг. 5 показан график средней концентрации в плазме CD24Fc ( $\pm$ SD) в результате лечения популяции, подлежащей оценке PK, среди субъектов, являющихся людьми. PK = фармакокинетический; SD = стандартное отклонение.

На фиг. 6 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $C_{max}$  CD24Fc относительно дозы для популяции, подлежащей оценке PK.

На фиг. 7 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $AUC_{0-42\text{сут}}$  CD24Fc относительно дозы для популяции, подлежащей оценке PK.

На фиг. 8 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $AUC_{0-\infty}$  CD24Fc относительно дозы для популяции, подлежащей оценке PK.

#### Подробное описание

Авторы изобретения обнаружили, что, неожиданно, белки, содержащие последовательность зрелого CD24, являются эффективными в отношении снижения уровней LDL-C и дополнительно являются полезными для лечения и/или предупреждения атеросклероза и для снижения риска сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз сердечно-сосудистой системы. Как описано более подробно в данном документе, CD24 представляет собой небольшой гликозил-фосфатидил-инозитол (GPI)-заякоренный гликопротеин с широко распространенной экспрессией как среди гемопоэтических, так и негемопоэтических клеток, который кодируется кодирующей последовательностью 240 пар оснований. Из 80 аминокислот первые 26 составляют сигнальный пептид, в то время как последние 23 служат в качестве сигнала для расщепления, делая возможным прикрепление GPI хвоста. В результате, молекула зрелого CD24 человека имеет только 31 аминокислоту. Аминокислота 31 является полиморфной в популяции человека. Транзиция С на Т в нуклеотиде 226 приводит к замене аланина (А) на валин (V). Так как данный остаток находится непосредственно в положении, являющемся N-концевым по отношению к сайту расщепления, и так как данное замещение не является консервативным, данные две аллели могут экспрессироваться с разной эффективностью на поверхности клетки. Исследования с трансфекцией кДНК продемонстрировали, что аллели CD24<sup>V</sup> более эффективно экспрессируются на поверхности клетки. В соответствии с этим в лейкоцитах периферической крови CD24<sup>V/V</sup> CD24 экспрессировался на более высоких уровнях, особенно на Т-клетках. Три набора данных демонстрируют, что CD24 представляет собой генетический модификатор в отношении MS (рассеянный склероз). На популяционном уровне генотип CD24<sup>V/V</sup> более чем в два раза чаще встречается по сравнению с нормальной популяцией. Среди мультиплексных в отношении MS семей аллель CD24<sup>V</sup> преимущественно передается MS пациентам по сравнению со здоровыми контролями. Кроме того, среди MS пациентов, у которых более тяжелая форма данного заболевания (в соответствии с расширенной шкалой оценки степени инвалидизации [EDSS]) на уровне или пре-

вышая 6,0, когда пациенты теряют способность самостоятельно ходить), у индивидуумов CD24<sup>V/V</sup> занимало в среднем 7 лет для достижения EDSS 6,0 с момента первого клинического симптома, при этом CD24<sup>a/v</sup> или CD24<sup>a/a</sup> индивидуумы достигали EDSS 6,0 через 13-15 лет. Наоборот, динуклеотидная делеция в 3' нетранслируемой области матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) CD24, которая снижает стабильность мРНК CD24 и, таким образом, снижает уровень экспрессии CD24, защищает человека от MS и других аутоиммунных заболеваний. На сегодняшний день не было показано, что CD24 влияет на уровень липидов.

#### 1. Определения.

Терминология, используемая в данном документе, используется только в целях описания конкретных воплощений и не предназначена быть ограничивающей. Как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если контекст явно не диктует иное.

Для перечисления интервалов числовых значений в данном документе каждое промежуточное число в промежутке с одной и той же степенью точности очевидно рассматривается. Например, для интервала 6-9 числа 7 и 8 рассматриваются помимо 6 и 9, а для интервала 6,0-7,0 числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 явно рассматриваются.

Термин "пептид" или "полипептид" представляет собой связанную последовательность аминокислот и может быть природной, синтетической или модификацией или комбинацией природной и синтетической.

Фраза "по существу, идентичный" может означать, что первая и вторая аминокислотная последовательность идентичны по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% на протяжении области 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 аминокислот.

Термин "лечение" или "лечащий" при ссылке на защиту животного от заболевания означает предупреждение, сдерживание, подавление или полное устранение заболевания. Предупреждение заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному перед началом данного заболевания. Сдерживание заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному после индукции заболевания, но перед его клиническим проявлением. Подавление заболевания включает введение композиции по настоящему изобретению животному после клинического проявления данного заболевания.

Термин "вариант" может означать пептид или полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Типичные примеры "биологической активности" включают способность связываться с толл-подобным рецептором и быть связанным специфичным антителом. Вариант может также обозначать белок с аминокислотной последовательностью, которая, по существу, идентична референсному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, т.е. замещение аминокислоты отличной аминокислотой с похожими свойствами (например, гидрофильность, степень и распределение заряженных областей), расценивается в данной области как типично вызывающая небольшое изменение. Данные небольшие изменения можно идентифицировать частично посредством рассмотрения индекса гидропатичности аминокислот, как понято в данной области. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на рассмотрении ее гидрофобности и заряда. В данной области известно, что аминокислоты с похожими индексами гидропатичности могут быть замещены и все еще сохранять функцию белка. В одном аспекте замещают аминокислоты, имеющие индексы гидропатичности, равные  $\pm 2$ . Гидрофильность аминокислот можно также использовать для обнаружения замен, которые приводили бы к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида делает возможным расчет самой большой локальной средней гидрофильности того пептида, полезная величина, которая, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США 4554101, включенный в данный документ во всей полноте посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих похожие значения гидрофильности, может приводить к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например иммуногенность, как понято в данной области. Замены можно осуществлять аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$  друг от друга. Как на индекс гидрофобности, так и значение гидрофильности аминокислот оказывает влияние конкретная боковая цепь данной аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, которые согласуются с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей данных аминокислот, что обнаруживается гидрофобностью, гидрофильностью, зарядом, размером и другими свойствами.

## 2. CD24.

В данном документе предложен белок CD24, который может содержать аминокислотную последовательность зрелого CD24 человека или последовательности других млекопитающих, которая соответствует внеклеточному домену (ECD) CD24, или ее вариант. Как описано выше, длина данной последовательности зрелого белка CD24 человека составляет 31 аминокислоту с переменным остатком аланина (A) с валином (V) на С-концевом конце

SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK(V/A) (SEQ ID NO: 1).

С-концевой валин или аланин может быть иммуногенным и может быть исключен из белка CD24 для уменьшения его иммуногенности. Вследствие этого белок CD24 может содержать аминокислотную последовательность или зрелый CD24 человека с отсутствием С-концевой аминокислоты

SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTK (SEQ ID NO: 2).

Несмотря на значительные вариации последовательности в аминокислотной последовательности зрелых белков CD24 из мыши и человека, функционально они являются эквивалентными, так как CD24Fc человека, как было показано, является активным у мыши. Аминокислотная последовательность ECD CD24 человека демонстрирует некоторую консервативность последовательности с белком мыши (39% идентичность; учетный номер Genbank NP\_033976), как показано на фиг. 3. Однако не удивительно, что идентичность, выраженная в процентах, не выше, так как ECD CD24 составляет только 27-31 аминокислоту в длину, в зависимости от вида, и связывание с некоторыми из его рецепторов, например Siglec 10/G, опосредовано его сиаловой кислотой и/или сахарами на основе галактозы данного гликопротеина. Идентичность аминокислотных последовательностей у внеклеточных доменов Siglec-10 человека (учетный номер Genbank AF310233) и белков рецепторов его мышинного гомолога Siglec-G (учетный номер Genbank NP\_766488) составляет 63%. В результате консервативности последовательности у CD24 мыши и человека главным образом в С-конце и при обилии сайтов гликозилирования значительные вариации в зрелых белках CD24 могут быть допустимы в использовании белка CD24, особенно если данные вариации не влияют на консервативные остатки в С-конце или не влияют на сайты гликозилирования либо из CD24 мыши, либо человека. Таким образом, белок CD24 может содержать аминокислотную последовательность зрелого CD24 мыши

NQTSVAPFPGNQNISASPNPTNATTRG (SEQ ID NO: 3).

Аминокислотная последовательность ECD CD24 человека демонстрирует большую консервативность последовательности с белком яванского макака (идентичность 52%; учетный номер UniProKB - I7GKK1), чем с мышью. Опять же, это не удивительно, при условии, что уровень идентичности, выраженный в процентах, не выше, так как длина ECD составляет только 29-31 аминокислоту у данных видов, и роль остатков сахаров в связывании со своим рецептором(ами). Аминокислотная последовательность рецептора Siglec-10 яванского макака не определена, но идентичность аминокислотной последовательности у белков Siglec-10 человека и макака-резуса (учетный номер GenBank XP\_001116352) составляет 89%. Таким образом, белок CD24 может содержать также аминокислотную последовательность зрелого CD24 яванского макака (или макака-резуса)

TVTTSAPLSSNSPQNTSTTPNPANTTTKA (SEQ ID NO: 10).

Белок CD24 может быть растворимым. Белок CD24 может содержать N-концевой сигнальный пептид, делая возможной секрецию из клетки, экспрессирующей данный белок. Последовательность сигнального пептида может содержать аминокислотную последовательность MGRAM-VARLGLGLLLLALLLPTQIYS (SEQ ID NO: 4). В качестве альтернативы сигнальная последовательность может представлять собой любую из последовательностей, которые обнаружены на других трансмембранных или секретируемых белках, или последовательностей, модифицированных на основе существующих сигнальных пептидов, известных в данной области.

## а). Слияние.

Белок CD24 может быть слит на своем N- или С-концевом конце с белковой меткой. Белковая метка может содержать фрагмент белка Ig млекопитающего, которое может представлять собой человека или мышь или другой вид. Этот фрагмент может содержать область Fc белка Ig. Область Fc может содержать по меньшей мере одну из шарнирных областей, домены CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> и CH<sub>4</sub> белка Ig. Белок Ig может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgA человека, и область Fc может содержать шарнирную область и домены CH<sub>2</sub> и CH<sub>3</sub> Ig. Область Fc может содержать изотип иммуноглобулина G1 (IgG1) человека, который может иметь последовательность SEQ ID NO: 7. Белок Ig может также представлять собой IgM, и область Fc может содержать шарнирную область и домены CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> и CH<sub>4</sub> IgM. Белковая метка может представлять собой аффинную метку, которая помогает при очистке данного белка, или метку, усиливающую растворимость, которая усиливает растворимость и выделение функциональных белков. Белковая метка может также повышать валентность белка CD24. Белковая метка может содержать GST, His, FLAG, Мус, MBP, NusA, тиоредоксин (TRX), малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитин (Ub), альбумин или Ig верблюдовых. Способы получения слитых белков и очистки слитых белков хорошо известны в данной области.

На основе доклинического исследования для конструирования слитого белка CD24Fc, идентифицированного в примерах, использовали усеченную форму нативной молекулы CD24 из 30 аминокислот,

которая не имеет конечной полиморфной аминокислоты перед сигнальным сайтом расщепления GPI (т.е. зрелый белок CD24, имеющий SEQ ID NO: 2). Последовательность зрелого CD24 человека сливают с доменом Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 7). Полноразмерный слитый белок CD24Fc предложен в SEQ ID NO: 5 (фиг. 1), и процессированная версия слитого белка CD24Fc, которая секретируется из клетки (т.е. не имеющая сигнальной последовательности, которая отщепляется), предложена в SEQ ID NO: 6. Процессированные полиморфные варианты зрелого CD24 (т.е. зрелый белок CD24, имеющий SEQ ID NO: 1), слитого с Fc IgG1, могут содержать SEQ ID NO: 11 или 12.

б). Продукция.

Белок CD24 может быть сильно гликозилирован и может быть вовлечен в функции CD24, такие как активация иммунных клеток и взаимодействие с молекулой молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP). Белок CD24 может быть получен с использованием эукариотической экспрессирующей системы. Экспрессирующая система может подразумевать экспрессию с помощью вектора в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO). Система может также представлять собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор с дефектом репликации, который может быть использован для инфицирования эукариотических клеток. Белок CD24 может быть также получен из стабильной клеточной линии, которая экспрессирует белок CD24 с помощью вектора или части вектора, который был интегрирован в клеточный геном. Стабильная клеточная линия может экспрессировать белок CD24 с помощью интегрированного ретровирусного вектора с дефектом репликации. Экспрессирующая система может представлять собой GPEX™.

в). Фармацевтическая композиция.

Белок CD24 может содержаться в фармацевтической композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемое количество белка CD24. Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может содержать растворитель, который сохраняет белок CD24 стабильным на протяжении длительного периода. Растворитель может представлять собой PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), в котором белок CD24 может сохраняться стабильным в течение по меньшей мере 66 месяцев при -20°C (от -15 до -25°C). Растворитель может быть способен вмещать белок CD24 в комбинации с другим лекарственным средством.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для парентерального введения, включая инъекцию или непрерывную инфузию, но не ограничиваясь ими. Препараты для инъекции могут быть в форме суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях и могут содержать агенты составления композиции, включая суспендирующие, стабилизирующие и диспергирующие агенты, но не ограничиваясь ими. Композиция может быть также предложена в форме порошка для растворения подходящим носителем, включая стерильную апиrogenную воду, но не ограничиваясь ею.

Фармацевтическая композиция может быть также приготовлена в виде депо-препарата, который может быть введен посредством вживления или посредством внутримышечной инъекции. Композиция может быть приготовлена со стабильными полимерными или гидрофобными веществами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле), ионообменными смолами или умеренно растворимыми производными (например, в виде умеренно растворимой соли).

г). Дозировка.

Дозу белка CD24 можно в конечном итоге определять посредством клинического испытания с определением дозы с приемлемой токсичностью и клинической эффективностью. Исходную клиническую дозу можно оценить посредством исследований фармакокинетики и токсичности у грызунов и приматов, отличных от человека. Доза белка CD24 может составлять от 0,01 до 1000 мг/кг и может составлять от 1 до 500 мг/кг в зависимости от желаемой степени снижения LDL-C и пути введения. Белок CD24 можно вводить посредством внутривенной инфузии или подкожной или интрамуральной (т.е. в пределах стенки полости или органа) инъекции, и доза может составлять 10-1000 мг, 10-500 мг, 10-240 мг, 10-120 мг или 10, 30, 60, 120 или 240 мг, где субъект представляет собой человека.

3. Способы лечения.

Белок CD24 можно вводить субъекту для снижения уровней LDL-C, которые могут быть повышены, и могут быть дополнительно повышены, превышая нормальный диапазон. Нормальный диапазон может быть определен стандартом, известным в данной области, таким как панель лечения взрослых в рамках национальной образовательной программы по холестерину (ATP) III или ее редакция 2005 г. (описано в *Circulation* 2002; 106:3143-421; и *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004 Aug 4; 44(3):720-32; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки), или в порядке, предусмотренном национальным институтом здоровья и клинического совершенствования (NICE). Субъект может иметь дефицит лизосомной кислой липазы (LAL), семейную гиперхолестеринемию или гиперлипидемию. Белок CD24 можно также вводить субъекту для лечения или предупреждения атеросклероза или снижения риска события сердечно-сосудистого заболевания, которое может представлять собой событие атеросклеротического заболевания сердечно-сосудистой системы (ASCVD). Событие ASCVD может представлять собой острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, стабильную или нестабильную стенокардию, коронарную артериальную реваскуляризацию или артериальную реваскуляризацию другого типа, инсульт, транзиторную ишемическую атаку или заболевание периферических артерий, предположительно

имеющее атеросклеротическое происхождение. Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек.

Субъект может быть мужского или женского пола. Субъект может быть любого возраста, но в частности может быть в возрасте 40-75 лет или больше чем 75 лет. Субъект может иметь уровень LDL-C выше чем или равный 70 мг/дл, 75 мг/дл или 190 мг/дл. Субъект может быть диабетиком или не быть диабетиком, быть в возрасте 40-75 лет и иметь уровень LDL-C 70-189 мг/дл. Субъект может иметь 10-летний риск ASCVD (определено, как нефатальный инфаркт миокарда, смерть от коронарного заболевания сердца или нефатальный или фатальный инсульт) более высокий, чем или равный 7,5% или 5-7,5%. Субъект может иметь характеристики субъекта, для которого снижение уровня LDL-C рекомендовано в соответствии с нормативами американской коллегии кардиологов/американской ассоциации сердца 2013 г. (Stone N.J., et al., 2013 ACC/AHA guideline of the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, J. Am. Coll. Cardiol. 2014; 63:2889-934). Субъект может иметь семейную гиперхолестеринемию, которая может быть вызвана мутацией в гене рецептора LDL, гене апополипротеина В или гене пропротеин конвертазы субтилизин/кексин типа 9. Субъект возможно ранее проходил лечение лекарственным средством, снижающим уровень LDL-C, таким как статин. Субъект возможно также переносил побочный эффект в результате данного лекарственного средства. Побочный эффект возможно представлял собой симптом в мышцах, такой как боль, болезненная чувствительность, скованность, судорога, слабость или общее утомление, и возможно представлял собой уровень креатинфосфокиназы, указывающий на повышенный риск в отношении побочных явлений в мышцах (который может более чем в 10 раз превышать верхний предел нормы). Субъект может трудно поддаваться лечению другим лекарственным средством, снижающим уровень холестерина, и может иметь уровень LDL-C выше чем или равный 75 мг/дл после лечения другим лекарственным средством, которое может представлять собой статин. Субъект может иметь реакцию "трансплантат против хозяина" и возможно демонстрировать 10% или большее повышение уровня LDL-C после перенесения трансплантации по сравнению с уровнем LDL-C субъекта перед трансплантацией. Субъект может иметь рассеянный склероз, ревматоидный артрит или аутоиммунное или воспалительное заболевание.

а). Введение.

Путь введения фармацевтической композиции может быть парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, внутрибрюшинную, подкожную, внутримышечную, интратекальную, внутрисуставную или прямую инъекцию, но не ограничивается ими. Фармацевтическую композицию можно водить пациенту, являющемуся человеком, кошкой, собакой, крупным животным или пернатым. Композицию можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 раз в сутки.

б). Комбинированное лечение.

Белок CD24 можно объединять с другим лечением, таким как лекарственное средство, включая статин, смолу, связывающую жёлчную кислоту, фибрат, ниацин, эзетимиб или лекарственное средство, которое повышает уровни рецептора LDL, включая антитело или другой ингибитор, который вызывает антагонизм или блокирует функцию PCSK9, но не ограничиваясь ими. Белок CD24 и другое лекарственное средство можно вводить вместе или последовательно.

Белок CD24 можно вводить одновременно или метроритмически с другими видами лечения. Термин "одновременный" или "одновременно" в том виде, в котором он используется в данном документе, означает, что белок CD24 и другое лечение вводят в пределах 48 ч, предпочтительно 24 ч, более предпочтительно 12 ч, еще более предпочтительно 6 ч и наиболее предпочтительно 3 ч или менее друг от друга. Термин "метроритмически" в том виде, в котором он используется в данном документе, обозначает введение агента в моменты времени, отличные от другого лечения, и с определенной частотой относительно повторного введения.

Белок CD24 можно вводить в любой момент перед другим лечением, включая примерно 120, 118, 116, 114, 112, 110, 108, 106, 104, 102, 100, 98, 96, 94, 92, 90, 88, 86, 84, 82, 80, 78, 76, 74, 72, 70, 68, 66, 64, 62, 60, 58, 56, 54, 52, 50, 48, 46, 44, 42, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ч, 55 мин, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 и 1 мин. Белок CD24 можно вводить в любой момент времени перед вторым лечением на основе белка CD24, включая примерно 120 ч, 118 ч, 116 ч, 114 ч, 112 ч, 110 ч, 108 ч, 106 ч, 104 ч, 102 ч, 100 ч, 98 ч, 96 ч, 94 ч, 92 ч, 90 ч, 88 ч, 86 ч, 84 ч, 82 ч, 80 ч, 78 ч, 76 ч, 74 ч, 72 ч, 70 ч, 68 ч, 66 ч, 64 ч, 62 ч, 60 ч, 58 ч, 56 ч, 54 ч, 52 ч, 50 ч, 48 ч, 46 ч, 44 ч, 42 ч, 40 ч, 38 ч, 36 ч, 34 ч, 32 ч, 30 ч, 28 ч, 26 ч, 24 ч, 22 ч, 20 ч, 18 ч, 16 ч, 14 ч, 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч, 4 ч, 3 ч, 2 ч, 1 ч, 55 мин, 50 мин, 45 мин, 40 мин, 35 мин, 30 мин., 25 мин, 20 мин, 15 мин, 10 мин, 9 мин, 8 мин, 7 мин, 6 мин, 5 мин, 4 мин, 3 мин, 2 мин и 1 мин.

Белок CD24 можно вводить в любой момент времени после другого лечения, включая примерно 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 6 мин, 7 мин, 8 мин, 9 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 16 ч, 18 ч, 20 ч, 22 ч, 24 ч, 26 ч, 28 ч, 30 ч, 32 ч, 34 ч, 36 ч, 38 ч, 40 ч, 42 ч, 44 ч, 46 ч, 48 ч, 50 ч, 52 ч, 54 ч, 56 ч, 58 ч, 60 ч, 62 ч, 64 ч, 66 ч, 68 ч, 70 ч, 72 ч, 74 ч, 76 ч, 78 ч, 80 ч, 82 ч, 84 ч, 86 ч, 88 ч, 90 ч, 92 ч, 94 ч, 96 ч, 98 ч, 100 ч, 102 ч, 104 ч, 106 ч, 108 ч, 110 ч, 112 ч, 114 ч, 116 ч, 118 ч и 120 ч. Белок CD24 можно вводить в любой момент вре-

мени после предыдущего лечения CD24, включая примерно 120 ч, 118 ч, 116 ч, 114 ч, 112 ч, 110 ч, 108 ч, 106 ч, 104 ч, 102 ч, 100 ч, 98 ч, 96 ч, 94 ч, 92 ч, 90 ч, 88 ч, 86 ч, 84 ч, 82 ч, 80 ч, 78 ч, 76 ч, 74 ч, 72 ч, 70 ч, 68 ч, 66 ч, 64 ч, 62 ч, 60 ч, 58 ч, 56 ч, 54 ч, 52 ч, 50 ч, 48 ч, 46 ч, 44 ч, 42 ч, 40 ч, 38 ч, 36 ч, 34 ч, 32 ч, 30 ч, 28 ч, 26 ч, 24 ч, 22 ч, 20 ч, 18 ч, 16 ч, 14 ч, 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч, 4 ч, 3 ч, 2 ч, 1 ч, 55 мин, 50 мин, 45 мин, 40 мин, 35 мин, 30 мин, 25 мин, 20 мин, 15 мин, 10 мин, 9 мин, 8 мин, 7 мин, 6 мин, 5 мин, 4 мин, 3 мин, 2 мин и 1 мин.

#### 4. Способы контроля активности белка CD24.

Активность белка CD24, вводимого субъекту, можно контролировать посредством детектирования концентрации LDL-C у субъекта. Субъект может проходить лечение белком CD24, например, лечение рассеянного склероза, ревматоидного артрита, реакции "трансплантат против хозяина", иммуно-обусловленного поражения тканей и т.п. Концентрация LDL-C может служить показателем уровня активности белка CD24 у субъекта, где снижение уровня LDL-C у пациента указывает на более высокую активность белка CD24. Способ может включать получение образца от субъекта и детектирование количества LDL-C в образце. Образец может представлять собой образец крови, такой как сыворотка или плазма. Способы измерения концентраций LDL-C хорошо известны в данной области, например, анализ на основе ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) или колориметрический/флуориметрический анализ после лечения на основе холестеринэстеразы и холестериноксидазы. Количество LDL-C можно измерять посредством расчета по формуле Фридвальда, который может включать расчет количества LDL-C в расчете на количества общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL-C), измеренные в данном образце. Количество HDL-C может быть измерено либо в результате процедуры осаждения сульфатом декстрана-Mg<sup>2+</sup> или прямым анализом HDL-C. Количество LDL-C может быть также измерено посредством анализа DIRECT LDL™, гомогенного анализа N-GENEOUS™ LDL или расчетных значений LDL-C, полученных из уравнения на основе ApoB: 0,41TC - 0,32TG + 1,70ApoB - 0,27, (Clin Chem 1997;43:808-815; содержания которой включены в данный документ посредством ссылки). Уровень LDL-C можно контролировать во времени и во время курса лечения белком CD24 для контроля ответа на лечение.

Количество белка CD24, вводимое субъекту, для лечения симптома, описанного в данном документе или известного в данной области, можно регулировать на основе уровня активности белка CD24, детектируемого с использованием LDL-C. Уровень LDL-C можно отслеживать на протяжении периода времени или во время курса лечения на основе белка CD24. Если концентрация LDL-C у субъекта уменьшается до уровня в пределах диапазона нормы, тогда количество белка CD24, вводимое субъекту, может быть снижено, например, снижая дозу белка CD24 или вводя его менее часто. Если концентрация LDL-C остается низкой или остается выше диапазона нормы, тогда количество белка CD24, вводимое субъекту, может быть увеличено, например, повышая дозу белка CD24 или вводя его более часто. В качестве альтернативы LDL-C концентрация частиц LDL (LDL-P) может быть также измерена для контроля активности белка CD24. Концентрацию LDL-P можно детектировать, непосредственно используя ЯМР (ядерный магнитный резонанс).

Уровни белка CD24, вводимые субъекту, можно также контролировать, что может быть сделано способом, включающим получение образца от субъекта и детектирование количества белка CD24 в образце. Образец может представлять собой образец крови, например сыворотку или плазму. Способы детектирования белка хорошо известны в данной области. Белок CD24 в образце можно детектировать посредством любого способа детекции белка, например иммунологического анализа, включая ELISA, Gygos, MSD, Biacore, AlphaLISA, Delfia, Singulex, Luminex, иммуно-ПЦР (полимеразная цепная реакция), клеточных анализов, RIA, вестерн-блоттинга, колонки для аффинной хроматографии и т.п. Способ ELISA может представлять собой ELISA "сэндвич" типа или конкурентный ELISA. Например, ELISA может включать приведение образца в контакт с антителом против белка CD24, приведение комплекса белок CD24-антитело против белка CD24 в контакт с меченым антителом, которое связывается с антителом против белка CD24, и измерение количества меченого антитела посредством детектирования сигнала, образованного меткой, где интенсивность сигнала коррелирует с количеством белка CD24 в образце.

Количество белка CD24, вводимое субъекту, можно регулировать (например, регулируя дозу и частоту введения) на основе фармакокинетического параметра для белка CD24. Например, количество белка CD24, вводимое субъекту, можно регулировать с получением концентрации CD24 в плазме выше, чем 1 нг/мл. В другом примере количество белка CD24, вводимое субъекту, регулируют с поддержанием неизменяющейся концентрации в плазме выше чем 1 нг/мл. В другом примере количество белка CD24, вводимое субъекту, можно регулировать с получением C<sub>max</sub> белка CD24 по меньшей мере примерно 1 нг/мл. В еще одном примере количество белка CD24, вводимое субъекту, можно регулировать с достижением уровня воздействия лекарственного средства, как описано AUC<sub>0-беск</sub>, белка CD24 по меньшей мере примерно 400000 нг·ч/мл.

Настоящее изобретение имеет много аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.



#### Пример 1. Получение растворимых белков CD24.

Осуществляли слияние зрелой последовательности CD24 с Fc IgG1. Аминокислотный состав данного слитого белка CD24 предложен на фиг. 1. Затем генерировали ретровирусный вектор с дефектом репликации, который запускает экспрессию слитого белка CD24Fc. Система GPEX™ (аббревиатура для экспрессии продукта гена) предлагает несколько важных преимуществ, наиболее важным из которых является в среднем более 1000 вставок/клетка, но только с 1 копией/вставка. Кроме того, так как ретровирус предпочтительно включается в транскрипционный активный локус, GPEX™ приводит к высокому уровню экспрессии целевого белка. Получали стабильные клеточные линии, которые продуцируют высокий выход CD24Fc. Кроме того, получали 45 г качественных продуктов GLP (глюкозо-1-фосфат) и приблизительно 100 г качественных продуктов cGMP (циклический гуанозинмонофосфат). Способы, используемые для последующей обработки сред, собранных из биореактора, обобщены в представленной ниже схеме (фиг. 2).

#### Очистка собранного материала.

Культуральные среды биореактора очищали с использованием фильтров глубинного типа Cuno 60M02 Maximizer с последующим использованием фильтра 0,22 мкм Millipore Opticap. Фильтрат собирали в стерильный пакет для сбора материала. Образцы получали для количественной оценки выхода CD24-Fc посредством ELISA.

#### Захват белка А.

Очищенные среды пропускают через колонку с белком А-смолой (GE Healthcare MabSelect) с концентрацией, не превышающей 16 г/л смолы (на основе ELISA) и временем контакта 4 мин. Колонку промывали равновесным буфером (50 мМ трис (трис(гидроксиэтил)аминометан) + 0,15 М NaCl pH 7,5), затем 10 мМ буфером цитрат натрия/лимонная кислота pH 6,0 в отношении сердечно-сосудистой системы. Связанный CD24Fc элюировали с колонки с использованием 10 мМ буфера цитрат натрия/лимонная кислота pH 3,5.

#### Инактивация вируса.

Фракцию элюата белка А сразу же доводили до pH 3,0 добавлением 2М соляной кислоты и держали при данном pH в течение 30 мин при температуре окружающей среды. Затем ее pH доводили до 5,0 добавлением 1М трис-основания и фильтровали с очисткой, используя стеклянный волокнистый фильтр 0,65 мкм (Sartorius Sartopure GF2) и 0,2 мкм (Sartorius Sartopore 2), в стерильный пакет для сбора материала.

#### Хроматография на SP-сефарозе.

Материал после инактивации вируса наносили на колонку с SP-сефарозой (GE Healthcare) в концентрации, не превышающей 25 г/л смолы (на основе A280 nm 1,22 равна 1 мг/мл), и с линейной скоростью потока 250 см/ч. Колонку промывали равновесным буфером (10 мМ цитрат натрия/лимонная кислота, pH 5,0) и связанный CD24Fc элюировали с колонки, используя 10 мМ буфер цитрат натрия/лимонная кислота + 0,2 М NaCl pH 5,0. Элюат собирали в стерильный пакет для сбора материала.

#### Хроматография Mustang Q.

pH элюата SP-сефарозы доводили до 7,5 добавлением 1М трис-основания и разводили WFI (вода для инъекций) для снижения проводимости. Разведенный материал наносили на фильтр Mustang Q (Pall) в концентрации, не превышающей 0,5 г/л смолы (на основе A280 nm 1,22 равна 1 мг/мл), и при скорости потока 5 объемов колонки/минута. Фильтр промывали равновесным раствором (10 мМ трис, pH 7,5) и CD24-Fc содержался в фильтрате и его собирали в стерильный пакет для сбора материала.

#### Вирусная фильтрация.

Фильтрат Mustang Q затем фильтровали при постоянном давлении 0,207 МПа через 0,2 мМ фильтр и фильтр для вирусов Millipore NFP (номинальный размер пор 20 нМ) и собирали в стерильный пакет для сбора материала.

#### Концентрация и конечный препарат.

Продукт концентрировали и проводили диафильтрацию с использованием 10 кДа ультрафильтрующей мембраны (Millipore Prep/Scale) в 10 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия pH 7,2 с приблизительно конечной концентрацией 10 мг/мл, как определено поглощением при 280 нм. Аналитические образцы вынимали из объема пока еще в боксе биологической безопасности. Осуществляли мечение и образцы переносили в QC для тестирования, в то время как объемные аликвоты хранили при 2-8°C в ожидании использования.

#### Пример 2. Фармакокинетика CD24 у мышей.

1 мг CD24Fc (CD24Fc) инъекцировали мышам C57BL/6, ранее не получавшим лечения, и отбирали образцы крови в разные моменты времени (5 мин, 1 ч, 4 ч, 24 ч, 48 ч, 7 суток, 14 суток и 21 сутки) с 3 мышами в каждый момент времени. Сыворотки разводили 1:100 и детектировали уровни CD24Fc, используя ELISA "сэндвич"-типа с использованием очищенного антитела против CD24 человека (3,3 мкг/мл) в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с пероксидазой антитела козы против Fc IgG человека (5 мкг/мл) в качестве детектирующих антител. Как показано на фиг. 4А, кривая распада CD24Fc демонстрировала типичный двухфазный распад белка. Первая фаза биораспределения имела

период полужизни 12,4 ч. Вторая фаза логически вытекает из модели исключения первого порядка из центрального компартмента. Время полужизни для второй фазы составляло 9,54 суток, что аналогично времени полужизни антител *in vivo*. Эти данные свидетельствуют о том, что слитый белок является очень стабильным в кровяном русле. В другом исследовании, в котором слитый белок инъецировали подкожно, наблюдали почти идентичное время полужизни, равное 9,52 суткам (фиг. 4Б). Что более важно, в то время как для достижения максимальных уровней CD24Fc в крови требовалось приблизительно 48 ч, общее количество слитого белка в крови, как измерено посредством AUC, по существу, было таким же в результате обоих путей инъецирования. Таким образом, с терапевтической точки зрения, разный путь инъецирования не должен влиять на терапевтический эффект лекарственного средства. Данное наблюдение сильно облегчило схему эксперимента в отношении токсичности для приматов и клинических испытаний.

Пример 3. CD24 снижает уровни LDL-C.

Данный пример демонстрирует, что CD24 снижает LDL-C. Изменения уровня LDL-C натощак в плазме относительно исходного уровня анализировали в клиническом испытании, которое описано ниже более подробно (см. раздел Методы данного примера). Уровни LDL-C натощак определяли в образцах, полученных в сутки 1, сутки 7 и сутки 42 для когорты 1 (группа 10 мг CD24Fc). Начиная с когорты 2 (группа 30 мг CD24Fc), данный отбор образцов липидов расширяли с включением суток 14. Данные обобщены в табл. 1. Вследствие неполного набора данных в когорте 1, когорты 2-5 использовали для анализа дозозависимого снижения уровней LDL-C. Наблюдали статистически значимое дозозависимое снижение (табл. 1).

Таблица 1

Изменение уровней LDL-C в сутки 7 (U1), сутки 14 (U2) и сутки 42 (U3)  
относительно исходного уровня (U0, определен как 100%)

Доза	Набл	Переменная	Мечение	N	Среднее	Ст Откл	Минимум	Максимум
#####								
10 мг	6	u0	Исходный уровень LDL	6	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1	7 суток соотношение LDL	5	99,6785886	8,5665505	87,0370370	107,7586207
		u2	14 суток соотношение LDL	0	,	,	,	,
		u3	42 суток соотношение LDL	6	102,9957054	5,3134796	96,8085106	110,5769231
30 мг	6	u0	Исходный уровень LDL	6	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1	7 суток соотношение LDL	6	96,9190313	9,5257894	86,9047619	113,4328358
		u2	14 суток соотношение LDL	6	97,5816504	15,2482354	84,5238095	122,3880597
		u3	42 суток соотношение LDL	6	106,1959745	8,2383407	95,2830189	113,4328358
60 мг	6	u0	Исходный уровень LDL	6	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1	7 суток соотношение LDL	6	90,7620588	12,6697467	72,0720721	106,1728395
		u2	14 суток соотношение LDL	6	102,5671170	5,2461286	96,5517241	110,3773585
		u3	42 суток соотношение LDL	6	105,1546943	13,4340830	93,2773109	127,1604938
120 мг	6	u0	Исходный уровень LDL	6	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1	7 суток соотношение LDL	6	87,1476632	16,0595374	61,7391304	106,4516129
		u2	14 суток соотношение LDL	6	95,2625418	11,8341667	83,4782609	116,1290323
		u3	42 суток соотношение LDL	6	100,1377165	9,9404474	87,1794872	112,3456790
240 мг	6	u0	Исходный уровень LDL	6	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1*	7 суток соотношение LDL	6	84,6472221	7,6553896	71,5596330	94,0476190
		u2*	14 суток соотношение LDL	5	90,1393086	5,2501807	86,2385321	99,0825688
		u3	42 суток соотношение LDL	6	107,0369419	14,7154796	79,8449612	121,1009174
Контроль	10	u0	Исходный уровень LDL	10	100,000000	0	100,000000	100,000000
		u1	7 суток соотношение LDL	10	93,7350811	8,9747121	83,7837838	107,1428571
		u2	14 суток соотношение LDL	8	104,5965396	13,8625952	83,7837838	125,2631579
		u3	42 суток соотношение LDL	10	102,6699920	16,2815599	77,0270270	138,1578947
#####								

\* P меньше 0,05 по сравнению с группой, получающей плацебо, t - критерий Стьюдента

Используя когорту 1 в качестве контроля определяли, снижал ли CD24Fc уровни LDL-C дозозависимым и зависимым от времени образом. Как показано в табл. 2, по сравнению с когортой 1, которая получала 10 мг CD24Fc, наблюдали значимое дозозависимое снижение уровней LDL-C (p меньше 0,0001).

Таблица 2

Дозозависимое и зависимое от времени уменьшение уровней LDL-C в когортах с модели GEE, используя когорту 1 (самая низкая доза в качестве контроля)

Параметр	Оценка	Ошибка	Стандартный уровень значимости		Z	Pr >  Z
			95%			
			Пределы			
Отсекаемый отрезок	98,0544	5,4745	87,3245	108,7842	17,91	<,0001
время	1,6471	2,1861	-2,6375	5,9317	0,75	0,4512
30 мг	3,7167	7,3244	-10,6389	18,0722	0,51	0,6118
время*30 мг	-1,4733	3,5435	-8,4183	5,4718	-0,42	0,6776
60 мг	-25,4898	14,4124	-53,7377	2,7581	-1,77	0,0770
время*60 мг	10,7245	5,0225	0,8805	20,5685	2,14	0,0327
120 мг	-21,2684	9,4771	-39,8431	-2,6936	-2,24	0,0248
время * 120 мг	6,6669	3,9357	-1,0468	14,3806	1,69	0,0903
240 мг	-15,8681	6,9247	-29,4402	-2,2960	-2,29	0,0219
время *240 мг	5,4390	2,8825	-0,2106	11,0887	1,89	0,0592

Наблюдали статистически значимое дозозависимое снижение уровня LDL-C, что свидетельствовало о том, что CD24Fc является эффективным для снижения уровня LDL-C у пациентов, являющихся людьми.

#### Методы.

Это была фаза I, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование действия однократных нарастающих доз для оценки безопасности, переносимости и PK (фармакокинетика) CD24Fc у взрослых здоровых субъектов мужского и женского пола. Всего в данное исследование включали 40 субъектов в 5 когортах из 8 субъектов. Шесть из 8 субъектов в каждой когорте получали исследуемое лекарственное средство и 2 субъекта получали плацебо (0,9% хлорид натрия, солевой раствор). Первой когорте давали дозу 10 мг. Следующие когорты получали 30 мг, 60 мг, 120 мг и 240 мг CD24Fc или подобранное плацебо, и им давали дозу, по меньшей мере, с интервалом 3 недели для обеспечения обзора данных по безопасности и переносимости для каждой предшествующей когорты. Введение следующей более высокой дозы новой когорте субъектов разрешали, только если был продемонстрирован адекватный уровень безопасности и переносимости.

В каждой когорте первые 2 субъекта представляли собой 1 реципиента исследуемого лекарственного средства и 1 реципиента плацебо в сутки 1. 3-5 и 6-8 субъекты получали дозу после суток 7 (с интервалом минимум 24 ч между подгруппами). Каждый субъект получал дозу, по меньшей мере, с интервалом 1 ч в одной и той же подгруппе. При необходимости введение дозы остальным субъектам откладывали, рассматривая обзор каких-либо значимых вопросов безопасности, которые могли возникнуть во время периода после введения дозы, включая первую или вторую подгруппы в той когорте. Последующая когорта получала дозу по меньшей мере через 3 недели после предыдущей когорты.

#### Период скрининга.

Скрининговый визит (визит 1) происходил вплоть до 21 суток перед началом периода активного лечения. После обеспечения информированного согласия субъекты подвергались процедурам скрининга на соответствие требованиям.

#### Период лечения.

Субъектов допускали в пункт клинической фармакологии (CPU) в сутки -1 (визит 2), и период рандомизированного лечения начинался в сутки 1 после минимум 10-часового ночного голодания. Субъектам случайным образом назначали лечение CD24Fc или плацебо в виде единственной дозы. Субъектов удерживали до утра суток 4.

#### Последующее наблюдение.

Все субъекты возвращались в CPU в сутки 7, сутки 14, сутки 21, сутки 28 и сутки 42 ( $\pm 1$  сутки) для визитов последующего наблюдения (визит 3, визит 4, визит 5, визит 6 и визит 7). Визит 7 был последним визитом для всех субъектов.

#### Длительность лечения.

Суммарная продолжительность лечения для каждого субъекта составляла вплоть до 63 суток. Однократное введение дозы происходило в сутки 1.

#### Количество субъектов.

Запланированное: 40 субъектов.

Подвергаемое скринингу: 224 субъекта.

Рандомизировано: 40 субъектов.

Завершено с: 39 субъектами.

Выбыло из наблюдения: 1 субъект.

Диагноз и главные критерии для включения: популяцию для данного исследования составляли здо-

ровые мужчины и женщины в возрасте от 18 до 55 лет включительно, с индексом массы тела от 18 до 30 кг/м<sup>2</sup> включительно.

Информация об исследуемом продукте и продукте сравнения.

CD24Fc: однократная доза 10 мг, 30 мг, 60 мг, 120 мг или 240 мг, вводимая посредством внутривенной инфузии; номер партии: 09MM-036. CD24Fc представлял собой полностью гуманизированный слитый белок, состоящий из зрелой последовательности CD24 человека и кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина G1 человека (Fc IgG1). CD24Fc поставляли в виде стерильного, прозрачного, бесцветного, не содержащего консервантов водного раствора для внутривенного введения. CD24Fc готовили в виде раствора для инъекции однократной дозы с концентрацией 10 мг/мл и pH 7,2. Каждый флакон с CD24Fc содержал 160 мг CD24Fc, 5,3 мг хлорида натрия, 32,6 мг гептагидрата двухосновного фосфата натрия и 140 мг моногидрата одноосновного фосфата натрия в 16 мл ±0,2 мл CD24Fc. CD24Fc поставлялся в прозрачных флаконах из боросиликатного стекла с хлорбутилкаучуковыми пробками и алюминиевыми отламывающимися колпачками.

Подобранное плацебо (0,9% хлорид натрия, солевой раствор), вводимое посредством внутривенной инфузии; номера партии: P296855, P311852, P300715, P315952.

Популяция, сформированная в соответствии с назначенным вмешательством (ИТТ), состояла из всех субъектов, которые получали по меньшей мере 1 дозу исследуемого лекарственного средства. ИТТ популяция представляла собой популяцию для первичного анализа в отношении информации о субъектах и оценки безопасности.

Клинико-инструментальные оценки (химия, гематология и анализ мочи) обобщали в результате лечения и визита. Изменение относительно исходного уровня также обобщали. Показатели жизненно важных функций (кровяное давление, частота ударов сердца, частота дыхательных движений и температура) обобщали в результате лечения и момента времени. Изменение относительно исходного уровня также обобщали. Все данные физического обследования перечислены. Параметры электрокардиограммы и изменение относительно исходного уровня обобщали. Полные интерпретации перечислены. Уровень LDL-C натощак и холестерина липопротеинов высокой плотности получали в сутки 1, сутки 7 и сутки 42 для когорты 1 (группа 10 мг CD24Fc). Начиная с когорты 2 (группа 30 мг CD24Fc), данный отбор образцов липидов расширяли с включением суток 14.

Пример 4. Фармакокинетика CD24 у человека.

В данном примере показан анализ фармакокинетики белка CD24 у человека.

Концентрация CD24Fc в плазме.

Как показано на фиг. 5, средняя концентрация CD24Fc в плазме повышалась пропорционально дозе вводимого CD24Fc. Для всех дозовых групп, за исключением 120 мг, максимальная средняя концентрация CD24Fc в плазме была достигнута через 1 ч после введения дозы. Максимальная средняя концентрация CD24Fc в плазме для группы 120 мг была достигнута через 2 ч после введения дозы. К суткам 42 (984 ч) средняя концентрация CD24Fc в плазме для всех групп снижалась до 2-4% от максимальной средней концентрации в плазме.

В табл. 3 обобщены PK параметры CD24Fc в результате лечения для популяции, подлежащей оценке PK.

Изложение фармакокинетических параметров CD24Fc в плазме в результате лечения - популяция, подлежащая оценке РК

Статистический параметр	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
$C_{\max}$ (нг/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	2495 (576)	9735 (1715)	30 083 (7179)	52 435 (9910)	95 865 (10 734)
CV (коэффициент вариации) %	23,1	17,6	23,9	18,9	11,2
Медиана	2371	9218	29 026	50 401	93 206
Мин, Макс	1967, 3390	8583, 13086	22557, 42628	40434, 65704	81296, 110110
Среднее геометрическое	2442	9625	29424	51666	95365
Геометрический CV%	22,8	16,1	23,0	19,0	11,2
$AUC_{0-42\text{сут}}$ (нг*ч/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	423061 (99615)	1282430 (88798)	3226255 (702862)	6541501 (2190944)	12704705 (1918596)
CV%	23,5	6,9	21,8	33,5	15,1
Медиана	434043	1302719	3124933	5785142	12563426
Мин, Макс	291020, 528079	1175733, 1403024	2487550, 4139748	4485193, 9415266	10466635, 15693606
Среднее геометрическое	412795	1279851	3163252	6249552	12586731
Геометрический CV%	25,0	7,0	22,0	33,8	15,0
$AUC_{0-6\text{нед}}$ (нг*ч/мл)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	462260 (116040)	1434464 (131316)	3497196 (705653)	7198196 (2458320)	13861796 (1962780)
CV%	25,1	9,2	20,2	34,2	14,2
Медиана	470426	1422205	3519732	6463665	13713034
Мин, Макс	310956, 596599	1281715, 1650503	2703655, 4309023	4910640, 10479940	11822988, 17175236
Среднее геометрическое	449583	1429578	3437036	6862129	13750972

Статистический параметр	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
Геометрический CV%	26,7	9,0	20,7	34,6	13,8
T <sub>max</sub> (ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	1,15 (0,42)	1,17 (0,41)	1,01 (0,01)	1,34 (0,51)	1,33 (0,52)
CV%	36,1	35,0	1,2	38,0	38,7
Медиана	1,00	1,00	1,00	1,03	1,00
Мин, Макс	0,92, 2,00	1,00, 2,00	1,00, 1,03	1,00, 2,00	1,00, 2,00
t <sub>1/2</sub> (ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	280,83 (22,37)	327,10 (41,32)	279,82 (65,59)	286,45 (23,38)	285,33 (24,33)
CV%	8,0	12,6	23,4	8,2	8,5
Медиана	279,61	317,23	264,69	290,76	287,74
Мин, Макс	258,87, 321,26	289,82, 394,24	210,18, 362,46	243,89, 309,26	249,24, 322,26
AUC <sub>экстр</sub> (%)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	7,61 (2,14)	10,44 (2,94)	7,88 (4,26)	8,92 (1,94)	8,46 (1,99)
CV%	28,1	28,2	54,0	21,8	23,5
Медиана	7,16	10,01	6,35	9,27	8,45
Мин, Макс	5,46, 11,47	7,10, 15,05	3,92, 14,48	5,49, 10,99	5,56, 11,50
CL (клиренс) (л/ч)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	0,0229 (0,0061)	0,0211 (0,0019)	0,0178 (0,0036)	0,0183 (0,0058)	0,0176 (0,0023)
CV%	26,7	8,8	20,5	31,7	13,3
Медиана	0,0216	0,0211	0,0173	0,0191	0,0175
Мин, Макс	0,0168, 0,0322	0,0182, 0,0234	0,0139, 0,0222	0,0115, 0,0244	0,0140, 0,0203
Vd (л)					
n	6	6	6	6	6
Среднее (SD)	9,153 (1,943)	9,867 (0,804)	7,289 (2,592)	7,491 (2,202)	7,276 (1,426)
CV%	21,2	8,1	35,6	29,4	19,6
Медиана	8,507	10,007	7,486	7,691	7,151
Мин, Макс	7,326, 12,010	8,771, 10,958	4,222, 11,139	4,933, 9,974	5,814, 9,438
AUC <sub>0-42сут</sub> = площадь под кривой концентрация-время с момента времени 0 до 42 суток; AUC <sub>0-беск</sub> = площадь под кривой концентрация-время с экстраполяцией на время от 0 до бесконечности; AUC <sub>экстр</sub> =					

Статистический параметр	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)
процент $AUC_{0-\infty}$ , который был обусловлен экстраполяцией на время от времени последней измеряемой концентрации, на субъект, до бесконечности; CL = общий клиренс; $C_{max}$ = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства в плазме; CV% = коэффициент вариации; Мин = минимум; Макс = максимум; SD = стандартное отклонение; $t_{1/2}$ = период полувыведения в конечной фазе; $T_{max}$ = время максимальной наблюдаемой концентрации в плазме лекарственного средства; $V_d$ = объем распределения.					

Анализ пропорциональной зависимости концентрации CD24Fc в плазме от дозы.

На фиг. 6 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $C_{max}$  CD24Fc в зависимости от дозы для популяции, подлежащей оценке РК. На фиг. 7 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $AUC_{0-42сут}$  CD24Fc в зависимости от дозы для популяции, подлежащей оценке РК. На фиг. 8 показан график пропорциональной зависимости от дозы  $AUC_{0-\infty}$  CD24Fc в зависимости от дозы для популяции, подлежащей оценке РК. В табл. 4 показан анализ мощности пропорциональной зависимости от дозы.

Таблица 4

Анализ мощности пропорциональной зависимости от дозы: фармакокинетические параметры CD24Fc в плазме - популяция, подлежащая оценке РК

Статистический параметр	CD24Fc 10 мг (N=6)	CD24Fc 30 мг (N=6)	CD24Fc 60 мг (N=6)	CD24Fc 120 мг (N=6)	CD24Fc 240 мг (N=6)	Пропорциональная зависимость от дозы		
						Оценка наклона	Стандартная ошибка	90% CI
$C_{max}$ (нг/мл)						1,172	0,040	(1,105, 1,240)
Среднее геометрическое	2441,8	9624,9	29424,4	51666,4	95364,9			
Геометрический CV%	22,8	16,1	23,0	19,0	11,2			
$AUC_{0-42сут}$ (нг*ч/мл)						1,088	0,036	(1,027, 1,148)
Среднее геометрическое	412794,8	1279850,8	3163251,7	6249551,9	12586731,3			
Геометрический CV%	25,0	7,0	22,0	33,8	15,0			
$AUC_{0-\infty}$ (нг*ч/мл)						1,087	0,036	(1,026, 1,148)
Среднее геометрическое	449583,5	1429577,5	3437035,6	6862128,7	13750972,4			
Геометрический CV%	26,7	9,0	20,7	34,6	13,8			

Геометрический CV% =  $100 \cdot \sqrt{\frac{SD^2}{\text{эксп}(SD^2)-1}}$ , где SD представляло собой стандартное отклонение логарифмически преобразованных данных. Степенную модель подгоняли методом ограниченного максимального правдоподобия с регрессией логарифмически преобразованного РК параметра на основе логарифмически преобразованной дозы. Как точку пересечения, так и наклон подбирали в виде фиксированных эффектов. Пропорциональную зависимость от дозы не исключали, если 90% CI находится в пределах (0,8, 1,25).  
 $AUC_{0-42сут}$  = площадь под кривой концентрация-время с момента времени 0 по 42 суток;  $AUC_{0-\infty}$  = площадь под кривой концентрация-время с экстраполяцией на время от 0 до бесконечности CI = доверительный интервал.  $C_{max}$  = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного вещества в плазме; CV% = коэффициент вариации; РК = фармакокинетический; SD = стандартное отклонение.

Оценка наклона  $C_{max}$  составляла 1,172 с CI 90% от 1,105 до 1,240.

Оценка наклона  $AUC_{0-42сут}$  составляла 1,088 с CI 90% от 1,027 до 1,148.

Оценка наклона  $AUC_{0-\infty}$  составляла 1,087 с CI 90% от 1,026 до 1,1.

Выводы по фармакокинетике.

$C_{max}$  и  $AUC$  CD24Fc в плазме повышались пропорционально дозам, вводимым мышам, обезьянам и человеку. CD24Fc в плазме достигал  $T_{max}$  от 1,01 до 1,34 ч.  $t_{1/2}$  CD24Fc в плазме находился в интервале от 280,83 до 327,10 ч.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности LDL-C у субъекта, включающий введение гуманизированного слитого белка CD24 нуждающемуся в этом субъекту, где указанный белок содержит (i) полипептид зрелого CD24 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2; и (ii) область Fc белка Ig млекопитающего, где область Fc слита с C-концом белка CD24.

2. Способ по п.1, где субъект имеет уровень LDL-C выше чем или равный 70 мг/дл.

3. Способ по п.1, где субъект имеет уровень LDL-C выше чем или равный 75 мг/дл.

4. Способ по п.1, где субъект имеет уровень LDL-C выше чем или равный 190 мг/дл.

5. Способ по п.1, где субъект ранее проходил лечение статином или антагонистом PCSK9.
6. Способ лечения или предупреждения атеросклероза у субъекта, включающий введение гуманизированного слитого белка CD24, охарактеризованного в п.1, нуждающемуся в этом субъекту.
7. Способ снижения риска атеросклеротического заболевания сердечно-сосудистой системы у субъекта, включающий введение гуманизированного слитого белка CD24, охарактеризованного в п.1, нуждающемуся в этом субъекту.
8. Способ по любому из пп.1-7, где белок Ig является белком Ig человека.
9. Способ по п.8, где область Fc содержит шарнирную область и домены CH2 и CH3 белка Ig человека, и где Ig выбран из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA.
10. Способ по п.8, где область Fc содержит шарнирную область и домены CH2, CH3 и CH4 IgM.
11. Способ по п.9, где гуманизированный слитый белок CD24 содержит последовательность SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
12. Способ по п.11, где аминокислотная последовательность гуманизированного слитого белка CD24 состоит из последовательности SEQ ID NO: 6, 11 или 12.
13. Способ по п.12, где аминокислотная последовательность гуманизированного слитого белка CD24 представлена SEQ ID NO: 6.
14. Способ по любому из пп.1-13, где гуманизированный слитый белок CD24 продуцируют с использованием эукариотической белок-экспрессирующей системы.
15. Способ по п.14, где экспрессирующая система представляет собой вектор, содержащийся в линии клеток яичника китайского хомяка.
16. Способ по п.14, где эукариотическая экспрессирующая система представляет собой ретровирусный вектор с дефектом репликации.
17. Способ по п.16, где ретровирусный вектор с дефектом репликации стабильно интегрирован в геном эукариотической клетки.
18. Способ по любому из пп.1-17, где гуманизированный слитый белок CD24 является растворимым.
19. Способ по любому из пп.1-18, где гуманизированный слитый белок CD24 является гликозилированным.
20. Способ определения активности гуманизированного слитого белка CD24 у субъекта, который проходит лечение указанным белком CD24, включающий сравнение количества LDL-C в образцах крови, полученных от субъекта перед и после введения белка CD24 субъекту, где снижение количества LDL-C в образце крови, полученном от субъекта после введения белка CD24, является показателем наличия активности белка CD24, где указанный белок CD24 содержит (i) полипептид зрелого CD24 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2; и (ii) область Fc белка Ig млекопитающего, где область Fc слита с С-концом белка CD24.
21. Способ по п.20, где белок CD24 вводят в количестве, учитывающем уровень LDL-C в образце, полученном после предыдущего введения субъекту белка CD24.
22. Способ по п.21, где белок CD24 вводят в количестве, необходимом для поддержания определенной активности или определенного уровня концентрации белка CD24 у субъекта.

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTNSGLAP**  
**NPRTNATTK**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF  
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 1А

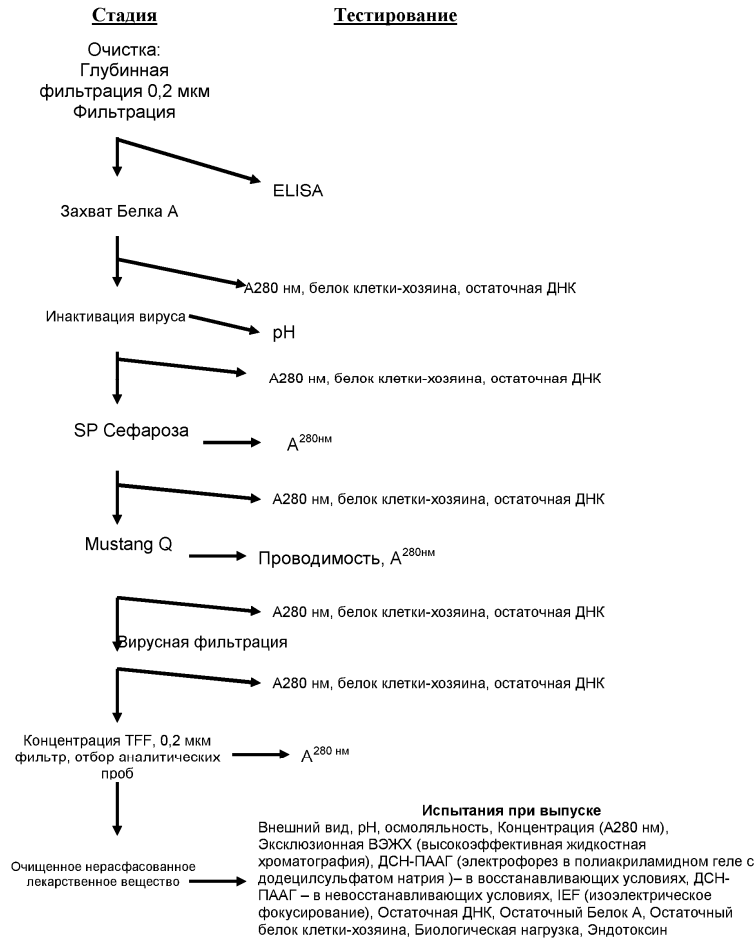
MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTNSGLAP**  
**NPRTNATTKV**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL  
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 1Б



MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSS**ETT**TG**TSS**NSSQ**S**TS**NS**GLAP  
**N**P**R****T****N**ATTKA**P**K**S****C****D****K****T****H****T****C****P****P****C****P****A****E****L****L****G****G****P****S****V****F****L****F****P****K****P****K****D****T****L****M****I****S****R**  
**T****P****E****V****T****C****V****V****D****V****S****H****E****D****E****V****K****F****N****W****Y****V****D****G****V****E****V****H****N****A****K****T****K****P****R****E****E****Q****N****S****T****Y****R****V****V**  
**S****V****L****T****V****L****H****Q****D****W****L****N****G****K****E****Y****K****C****K****V****S****N****K****A****L****P****A****I****E****K****T****I****S****K****A****K****Q****P****R****E****P****Q****V****Y****T****L**  
**P****P****S****R****D****E****L****T****K****N****Q****V****S****L****T****C****L****V****K****G****F****Y****P****S****D****I****A****V****E****W****E****S****N****G****Q****P****E****N****N****Y****K****T****P****P****V****L****D**  
**S****D****G****S****F****F****L****Y****S****K****L****T****V****D****K****S****R****W****Q****Q****N****V****F****S****C****S****V****M****H****E****A****L****H****N****H****Y****T****Q****K****S****L****S****L****S****P****G****K**

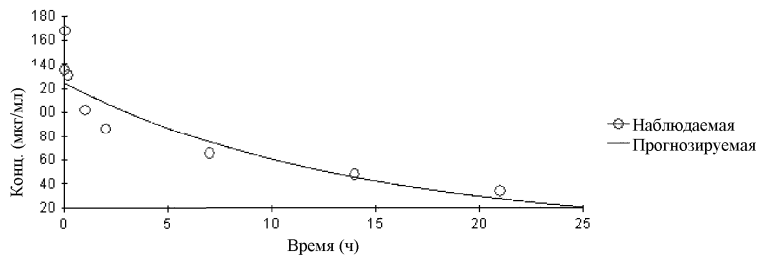
Фиг. 1B



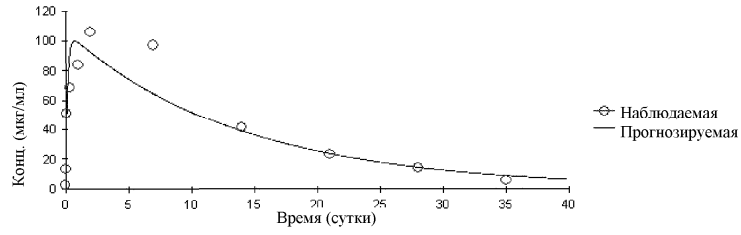
Фиг. 2

Мышь CD24 NQ**T****S**V**A**P**F**P**G**N--Q**N**I**S**A**S**-----P**N**P**R****T****N**ATTR**G**  
 - \* - \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
 Человек CD24 **S**E**T****T****T****G****T****S****S**-**N****S****S****Q****S****T****S****N****S**-**G****L**A**P****N**P**R****T****N**ATTKA (V)

Фиг. 3



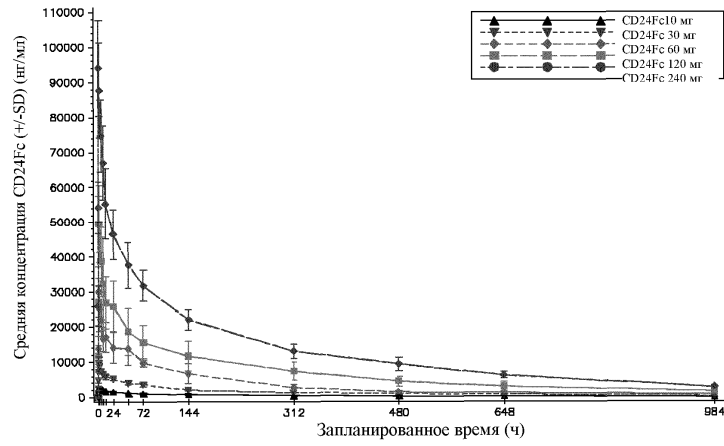
Фиг. 4A



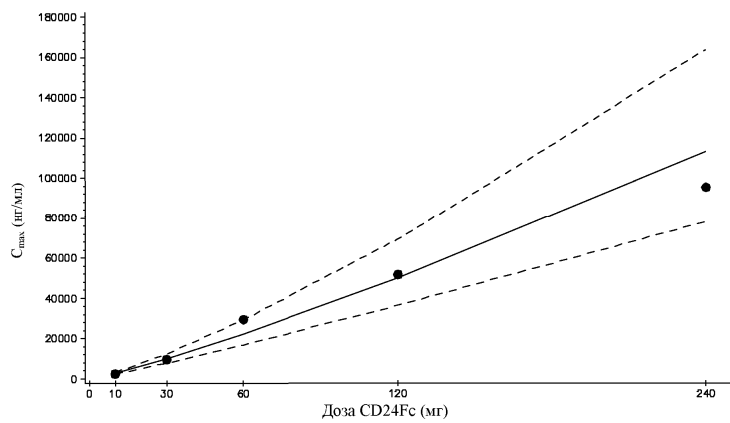
Фиг. 4Б

Пути	Параметр	Единицы	Оценка	Ст. Ошибка	CV%
В/В	AUC	Сутки*мкг/мл	1709,5	305,2	17,85
П/К			1453,2	181,4	12,49
В/В	K10_HL	сутки	9,52	1,96	20,56
П/К			9,54	1,43	14,97
В/В	Cmax	мкг/мл	124,4	10,3	8,31
П/К			99,6	11,1	11,11

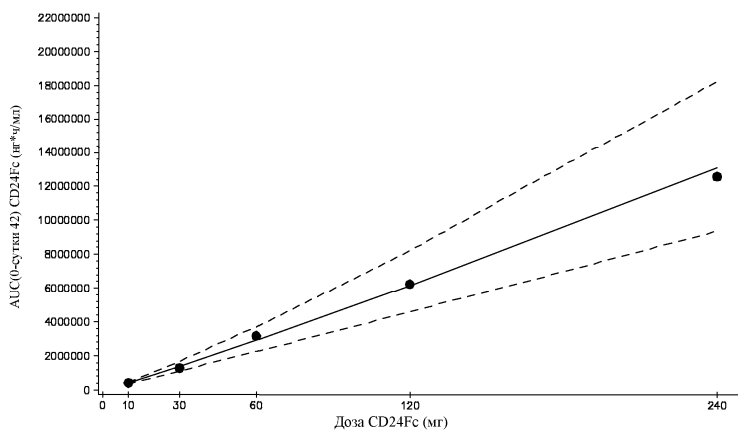
Фиг. 4В



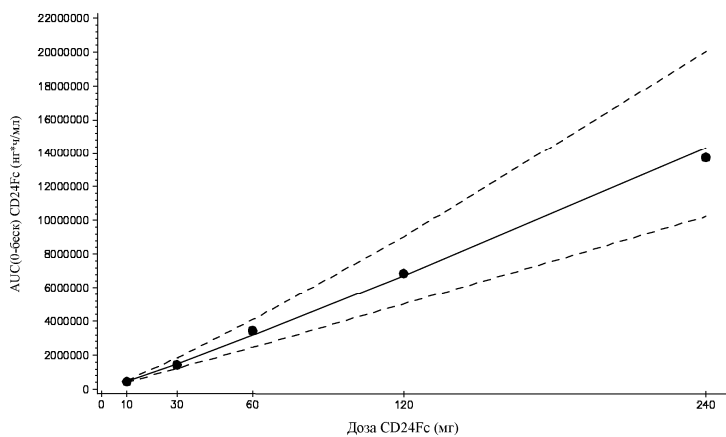
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

