

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091567 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.30

(22) Дата подачи заявки
2015.02.23

(51) Int.Cl. C07K 14/81 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 47/68 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01) A61P 7/08 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ МТИ

(31) 61/943,617

(32) 2014.02.24

(33) US

(62) 201691702; 2015.02.23

(71) Заявитель:
ТАКЕДА ГМБХ (DE); ТАКЕДА
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ
ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:
Чэмберлэйн Аарон, Лю Цян, Шмидт
Матиас (US)

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

(57) В изобретении предложены химерные белки МТИ, последовательности ДНК для их получения и фармацевтические композиции и способы их применения.

A1

202091567

202091567

A1

ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ МТИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к молекулярной биологии, фармакологии и медицине.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Мочевой Трипсиновый Ингибитор (МТИ), также известный как улинастатин, уристатин, уринастатин, улистин, человеческий ингибитор 30 (ЧИ-30), мингин и бикунин, представляет собой ингибитор протеазы с молекулярной массой около 40 кДа. МТИ присутствует в человеческой моче и крови (чМТИ) и имеет различные физиологические активности, такие как ингибирующее действие на семейство сериновых протеаз, таких как трипсин, α -химотрипсин, плазмин, катепсин-G и эластазу лейкоцитов. МТИ также имеет иммуномодулирующий эффект и может препятствовать высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерлейкин-1 (ИЛ-1) и интерлейкин (ИЛ-6). Кроме того, МТИ также препятствует активному димер-опосредованному сигнальному пути PDGF-D (PDGF-DD)/PDGF-BBR путем нейтрализации димера.

[0003] чМТИ получил разрешение на медицинское применение, один продукт продается в Японии под торговым названием Мираклид и является выделенным из мочи человека. На самом деле, чМТИ, выделенный из мочи человека, в настоящее время продается несколькими производителями для лечения панкреатита и вызванной шоком острой сердечно-сосудистой недостаточности.

[0004] МТИ сначала вырабатывается в организме человека, как белок-предшественник под названием АМВР (предшественник α 1-микроглобулина/бикунина), который закодирован на человеческой хромосоме 9. Протеолиз АМВР позволяет получить свободный МТИ, содержащий 143 аминокислоты. МТИ содержит два домена Кунитца, которые, как известно, ингибируют сериновые протеазы, фланкированные неструктурированными аминокислотами по N- и C-концам МТИ. Как ожидается, эти два домена предоставляют различные специфичности ингибирования протеазы, благодаря различным аминокислотам, участвующим в связывании протеазы. По аналогии с другими ингибиторами сериновых протеаз (например, ВРТИ - бычий панкреатический ингибитор трипсина) мы можем спрогнозировать, что две ключевые аминокислоты для ингибирования протеазы включают Met26 (домен Кунитца 1) и Arg88 (домен Кунитца 2).

Мало что известно об участии различных участков МТИ во время ингибирования различными протеазами, но, как было показано, удаление домена Кунитца 1 меняет специфичность протеаз, раскрывая новую ингибирующую активность в отношении фактора Ха и плазменного калликриена. Полноразмерный МТИ не демонстрирует ингибирования этих двух протеаз (Morishita et al., Thrombosis Research 1994 год, том 73 (3/4) стр. 193-204). МТИ также содержит два присоединенных сахара, один О-связанный на Ser10 и один N-связанный на Asn45. Период полувыведения МТИ у грызунов и человека составляет 4-30 минут (Fries et al., International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000 год, том 32, стр. 125-137).

[0005] Химерный белок МТИ должен содержать оптимизированную последовательность аминокислот, в том числе лучшие стартовые и стоп точки любых доменов МТИ, и может быть слит с другим белком для улучшения свойств, таких как экспрессия, очистка, период полувыведения и стабильность. Точная последовательность партнера по слиянию нуждается в определении и может включать изменения в линкерах, стартовых/стоп точках и/или мутации, которые могут изменить функциональные свойства партнера по слиянию.

Известны варианты улинастатина, полученные из мочи, из WO199856916, US5792629, US5407915, US5409895, US7019123 и US6583108. Концепция химерных белков улинастатина (и его вариантов) была раскрыта в US20080181892, US5541288 и US20080255025. Некоторые химерные белки МТИ описаны в CN 103044554A. Химерные белки из CN 103044554A относятся к конкретным вариантам в домене Fc, по-видимому, для избежания каких-либо Fc-опосредованных фармакологических эффектов (АЗКЦ, CDC). Было неожиданно обнаружено, что МТИ-Fc с IgG1 дикого типа хорошо переносится и обеспечивает значительное увеличение периода полувыведения. Кроме того, по сравнению с химерными белками МТИ из CN 103044554A химерные белки МТИ по настоящему изобретению, в частности SEQ ID NO: 1, демонстрируют большую температурную стабильность.

[0006] Настоящее изобретение относится к химерным белкам МТИ, фармацевтическим композициям, содержащим их, способам получения и их применению.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится к химерным белкам МТИ, содержащим домен МТИ и партнера по слиянию, причем домен МТИ функционально связан с партнером по слиянию. Настоящее изобретение относится к химерным белкам МТИ, содержащим домен МТИ и домен Fc, причем домен МТИ функционально связан с доменом Fc.

Настоящее изобретение также относится к выделенным химерным белкам МТИ, как описано в настоящем документе.

[0008] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему последовательность, включающую SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 и 29. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:1. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:3. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:5. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:7. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:9. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:11. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:13. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:15. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:17. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:19. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:21. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:23. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:25. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:27. В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему SEQ ID NO:29.

[0009] В соответствии с другим вариантом реализации, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерные белки МТИ, содержащие химерные белки МТИ, описанные в данном документе. Кроме того, изобретение относится к ДНК-последовательностям, изложенным в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 и 30. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный белок МТИ, дополнительно содержит вектор, содержащий контролирующие последовательности, с которыми нуклеиновая кислота является функционально связанной. В другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащую последовательность нуклеиновой

кислоты, которая кодирует химерный белок МТИ, такой как у млекопитающих, насекомых, *E. coli* или у дрожжевой клетки, а также поддержание клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется молекула химерного белка.

[0010] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерные белки МТИ, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0011] В соответствии с еще одним вариантом реализации настоящего изобретения предложен способ лечения расстройств, связанных с МТИ, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества химерного белка МТИ, описанного в данном документе.

[0012] То есть настоящее изобретение относится к применению химерного белка МТИ в качестве лекарственного средства, в том числе при изготовлении лекарственного средства, а также применению химерного белка МТИ, описанного в данном документе, для лечения расстройств, связанных с МТИ, описанных в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0013] На фиг. 1 представлена структура домена МТИ и сайтов гликозилирования.

[0014] На фиг. 2 представлены два конструкта МТИ-Fc, демонстрирующие измененные линкеры.

[0015] На фиг. 3 представлены различные конструкты МТИ-Fc по настоящему изобретению.

[0016] На фиг. 4 представлена стратегия сборки ДНК (SLIC), используемая в химерном конструкте МТИ.

[0017] На фиг. 5 представлено подавление активности протеазы (трипсина) с помощью МТИ и МТИ-Fc1, SEQ ID NO:1.

[0018] На фиг. 6 представлено подавление активности протеазы (химотрипсина) с помощью МТИ-Fc1, UFC1, SEQ ID NO:1.

[0019] На фиг. 7 представлено подавление активности протеазы (множественных протеаз) с помощью МТИ-Fc1, UFC1, SEQ ID NO:1.

[0020] На фиг. 8 представлено подавление секреции цитокинов (IL-6) с помощью МТИ и МТИ-Fc1, МТИ-Fc, SEQ ID NO:1

[0021] На фиг. 9 представлена очистка полученной продукции химерных белков МТИ.

[0022] На фиг. 10 представлено влияние SEQ ID NO:1 на индуцированный ЛПС C5a у мышей C3H.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0023] Настоящее изобретение относится к химерным белкам МТИ, домену МТИ и партнеру по слиянию, причем домен МТИ функционально связан с партнером по слиянию. Химерные белки МТИ по настоящему изобретению оказывают ингибирующее действие на протеазы, в том числе на трипсин.

[0024] В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой полипептид Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой полипептид Fc человека. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой аналог(и) полипептида Fc человека. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой фрагмент(ы) полипептида Fc человека. В других вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой полипептид Fc мыши. В других вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой полипептид Fc крысы.

[0025] В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой альбумин человека. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой аналог альбумина человека. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой модифицированный альбумин человека. В некоторых вариантах реализации изобретения партнер по слиянию представляет собой фрагмент альбумина человека.

[0026] В некоторых вариантах реализации изобретения домен МТИ представляет собой МТИ человека (чМТИ). В некоторых вариантах реализации изобретения домен МТИ представляет собой аналог чМТИ. В некоторых вариантах реализации изобретения домен МТИ представляет собой фрагмент чМТИ. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок МТИ содержит домен чМТИ дикого типа.

[0027] В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок МТИ содержит домен МТИ дикого типа человека и домен Fc человека. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок МТИ содержит домен чМТИ дикого типа и линкерный домен, а также домен Fc человека.

[0028] В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок МТИ содержит домен МТИ дикого типа человека и альбумин человека или его аналог или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок МТИ содержит домен чМТИ дикого типа, линкерный домен и альбумин человека или его аналог или его фрагмент.

[0029] В некоторых вариантах реализации изобретения домен Fc связывается с рецептором Fc на клетке человека. В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения молекулы в сыворотке является значительно больше, чем период полувыведения домена МТИ в одиночку. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибирующая протеазу активность домена МТИ молекулы является такой же или большей, чем домена МТИ в одиночку. В некоторых вариантах реализации изобретения введение молекулы мыши уменьшает воспалительные реакции, включая, но не ограничиваясь, снижение активации иммунных клеток или уменьшение производства, секреции или активности цитокинов или хемокинов.

[0030] Подразумевается, что домен МТИ может быть функционально связан с партнером по слиянию с помощью линкерного домена.

[0031] Настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему домен МТИ, слитый с полипептидом, выбранным из группы, состоящей из а) домена Fc, б) аналога домена Fc и в) фрагмента домена Fc, в котором домен МТИ слит с доменом Fc, его аналогом или его фрагментом с помощью линкерного домена. Настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему домен чМТИ, слитый с полипептидом, выбранным из группы, состоящей из а) домена Fc, б) аналога домена Fc и в) фрагмента домена Fc, в котором домен чМТИ слит с доменом Fc, его аналогом или его фрагментом с помощью линкерного домена.

[0032] Настоящие химерные белки включают белки, имеющие мономерные и мультимерные формы, будь то полученные с помощью гидролизата интактного антитела или полученные другими способами.

[0033] Термины "мультимер" и "мультимерный" относятся к белкам, в которых домены Fc или молекулы, содержащие домены Fc, имеют две или более полипептидные цепи, связанные ковалентно, нековалентно или имеющие как ковалентные, так и нековалентные взаимодействия. Термин мультимер включает термин димер.

[0034] Термин "димер" относится к белкам, в которых домены Fc или молекулы, содержащие домены Fc, имеют две полипептидные цепи, связанные ковалентно, нековалентно или имеющих как ковалентные, так и нековалентные взаимодействия. То есть термин "димер" относится к химерным белкам МТИ, в которых два домена Fc являются связанными ковалентно, нековалентно или имеющими как ковалентные, так и нековалентные взаимодействия. Более конкретно, термин "димер" относится к химерным белкам МТИ, в которых два домена Fc являются связанными ковалентно.

[0035] Настоящее изобретение относится к химерному белку МТИ, содержащему домен МТИ, слитый с полипептидом, выбранным из группы, состоящей из а) альбумина, б)

аналогов альбумина, в) фрагментов альбумина. Настоящее изобретение также относится к химерному белку МТИ, содержащему домен чМТИ, слитый с полипептидом, выбранным из группы, состоящей из а) альбумина человека, б) аналогов альбумина, в) фрагментов альбумина человека, причем чМТИ является слитым с альбумином, его аналогом или его фрагментом с помощью линкерного домена.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМИНОВ

[0036] Термины, применяемые в данном описании и формуле изобретения, определены, как изложено ниже, если не указано иное.

[0037] В данном контексте термины "связанный", "химерный" или "слияние" используются как взаимозаменяемые.

[0038] Эти термины относятся к соединению вместе более двух элементов или компонентов или доменов любыми средствами, в том числе химической конъюгацией или средствами на основе рекомбинации. Способы химической конъюгации известны в данной области техники.

[0039] "Химерный белок" относится к полипептиду, имеющему две или более ковалентно связанные друг с другом части, где одна или более частей являются полученными из различных белков. Эти две части могут быть соединены непосредственно с помощью одной пептидной связи (например, участки, связанные непосредственно друг с другом), либо через пептидный линкер, содержащий один или более аминокислотных остатков (например, с промежуточной аминокислотой или аминокислотной последовательностью между частями). Как правило, ДНК, кодирующая две части, и линкер будут в рамке считывания друг с другом и получены с применением рекомбинантных технологий.

[0040] "Домен МТИ" представляет собой белок или пептид, который имитирует активность МТИ. Подразумевается, что домен МТИ по настоящему изобретению может быть изменен таким образом, что они будут иметь последовательности отличные от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, сохраняя при этом желаемую активность нативной последовательности. Предпочтительнее, чтобы домен МТИ представлял собой нативный человеческий МТИ (чМТИ), его аналоги и варианты. Варианты чМТИ включают замены или модификации одной или нескольких аминокислот нативного чМТИ, которые не являются необходимой структурной особенностью или обеспечивают функциональную активность, в том числе консервативные замены. Варианты чМТИ включают удаление или вставку одной или нескольких аминокислот в нативном чМТИ, которые не являются необходимой

структурной особенностью или обеспечивают функциональную активность. Варианты чМТИ включают замены или модификации одной или нескольких аминокислот нативного чМТИ с целью изменить одно или более свойств или активностей. Варианты чМТИ включают удаление или вставку одной или нескольких аминокислот в нативном чМТИ с целью изменить одно или более свойств или активностей МТИ. Варианты чМТИ включают удаление или изменение сайтов гликозилирования в нативном человеческом УТИ. Варианты чМТИ включают удаление или изменение одного или более доменов Кунитца. Варианты чМТИ могут быть введены с помощью стандартных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез.

[0041] Последовательность аминокислотных остатков рекомбинантного домена чМТИ изложена в SEQ ID NO:31. Как правило, домен МТИ содержит последовательность, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичную рекомбинантному домену чМТИ, изложенному в SEQ ID NO:31.

[0042] "Домен Fc" представляет собой полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первой константной области домена иммуноглобулина и, в некоторых случаях, части или всех шарниров. Таким образом, домен Fc относится к неантигенной части связывания антитела, будь то в мономерной или мультимерной форме. Антитело, из которого происходит домен Fc, является предпочтительно человеческого происхождения и может быть любым из иммуноглобулинов, хотя IgG1 и IgG2 являются предпочтительными.

[0043] Домен Fc содержит шарнирную область тяжелой цепи. Под термином "шарнир", или "шарнирная область", или "шарнирная область антитела", или "шарнирная область иммуноглобулина" в данном описании подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты, между первым и вторым константными доменами антитела, непосредственно выше места расщепления папаином. Соответственно, для IgG Fc-домен содержит домены CH2 и CH3 иммуноглобулина и шарнирную область между CH1 и CH2. Несмотря на то, что границы фрагмента Fc могут варьировать, фрагмент Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как такой, который содержит остатки C226 или P230 с его карбоксильного конца, причем нумерация произведена согласно индексу EU и в Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, как более подробно описано ниже, аминокислотные модификации выполнены в домене Fc, например, для изменения связывания с одним или более рецепторами FcγR или с рецептором FcRn.

[0044] Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения термин домен Fc содержит шарнирную область, которая может быть укороченной, модифицированной

путем замены, делеции и/или вставки и дополнительно модифицированная или немодифицированная шарнирная область может быть местом прикрепления линкерного домена.

[0045] "Аналог домена Fc" относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована из нативного Fc, но по-прежнему содержит сайт связывания рецептора реутилизации. Термин аналог домена Fc включает молекулу или последовательность, которая является гуманизированной из нативного не человеческого Fc. Термин аналог домена Fc также включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует или есть модификации одного или более нативных остатков Fc, которые влияют или участвуют в формировании дисульфида, несовместимости с клеткой-хозяином, N-концевой гетерогенности при экспрессии, стабильности, гликозилировании, взаимодействии с комплементом, связывании с рецептором реутилизации Fc и/или взаимодействии с рецептором Fcγ.

[0046] Термины "фрагменты домена Fc" или "фрагмент домена Fc" относятся к нативному Fc, из которого один или более сайтов были удалены там, где удаленный сайт(ы) не образует структурные особенности или функциональную активность, которая является необходимой для химерных белков по настоящему изобретению. Фрагменты домена Fc содержат удаление остатков из нативного Fc или укорочение нативного Fc и могут содержать замены остальных остатков. Вставленные или измененные остатки (например, замещенные остатки) могут быть природными аминокислотами или измененными аминокислотами, пептидомиметиками, неприродными аминокислотами или D-аминокислотами.

[0047] Как правило, домен Fc содержит последовательность, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичную IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, в частности, IgG1 или IgG2 человека.

[0048] Термин домен Fc охватывает нативный Fc и аналоги Fc и включает мономерные и мультимерные формы, будь то полученные с помощью гидролизата интактного антитела или полученные другими способами.

[0049] В некоторых вариантах реализации изобретения домен Fc содержит по меньшей мере шарнирный домен (верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен CH2 (или его вариант или его фрагмент) и домен CH3 (или его вариант или его фрагмент). В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из шарнирного домена (верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена CH2 (или его варианта или его фрагмента) и домена CH3 (или его варианта или его фрагмента). В

некоторых других вариантах реализации изобретения домен Fc состоит из шарнирного домена (верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена CH2 (или его варианта или его фрагмента), домена CH3 (или его варианта или его фрагмента) и домена CH4 (или его варианта или его фрагмента). В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из шарнирного домена (верхней, средней и/или нижней шарнирной области) и домена CH2. В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из шарнирного домена (верхней, средней и/или нижней шарнирной области) и домена CH3 (или его варианта или его фрагмента). В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из домена CH2 (или его варианта или его фрагмента) и домена CH3 (или его варианта или его фрагмента). В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из полного домена CH2 и полного домена CH3. В другом варианте реализации изобретения домен Fc состоит из полного домена CH2 и полного домена CH3. В одном варианте реализации изобретения домен Fc изобретения содержит по меньшей мере часть молекулы Fc, известной в данной области техники, которая является необходимой для связывания FcRn. В другом варианте реализации изобретения домен Fc по изобретению содержит по меньшей мере часть молекулы Fc, известной в данной области техники, которая является необходимой для связывания Белка А. В другом варианте реализации изобретения домен Fc по изобретению содержит по меньшей мере часть молекулы Fc, известной в данной области техники, которая является необходимой для связывания Белка G.

[0050] Согласно данному изобретению домен Fc, как правило, относится к полипептиду, содержащему весь домен или часть домена Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. Как было рассмотрено выше, это включает, но без ограничений, полипептиды, содержащие всю шарнирную область, домены CH1, CH2 и/или CH3, а также фрагменты таких пептидов, содержащих, например, шарнир, домены CH2 и CH3. Домен Fc может быть получен из любого иммуноглобулина любого вида и/или подтипа, в том числе, но не ограничиваясь, человеческого IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM антитела. Домен Fc содержит последние две константные области доменов иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, последние три константные области доменов иммуноглобулина IgE и IgM и гибкий шарнир, N-концевой по отношению к этим доменам. Для IgA и IgM Fc может содержать цепь J.

[0051] Домен Fc в данном контексте охватывает нативный Fc и молекулы варианта Fc. Как и в случае вариантов Fc и нативных белков Fc, термин домен Fc включает молекулы в мономерной и мультимерной форме, будь то расщепленные из антитела или полученные другими способами.

[0052] Как указано в данном описании, следует понимать, что любой домен Fc может быть модифицирован таким образом, что он может отличаться в аминокислотной последовательности от нативного домена Fc встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина. В некоторых примерных вариантах реализации изобретения домен Fc сохраняет эффекторную функцию, например, связывание FcγR. В некоторых примерных вариантах реализации изобретения домен Fc утрачивает эффекторную функцию, например, связывание FcγR.

[0053] Домен Fc по изобретению может быть получен из различных молекул иммуноглобулинов. Например, домен Fc может содержать домен CH2 и/или CH3, полученный из IgG1, и шарнирную область, полученную из IgG3.

[0054] В некоторых вариантах реализации химерные белки МТИ содержат домен Fc. Домены Fc, пригодные для получения химерных белков МТИ по настоящему изобретению, могут быть получены из нескольких различных источников. В предпочтительных вариантах реализации изобретения домен Fc химерных белков МТИ происходит от человеческого иммуноглобулина. Однако предполагается, что домен Fc может быть получен из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, в том числе, например, грызунов (например, мыши, крысы, кролика, морской свинки) или нечеловекообразных видов приматов (например, Шимпанзе, Макаки). Кроме того, домен Fc химерных белков МТИ или его часть может быть получена из любого класса иммуноглобулина.

[0055] Термины "дикий тип" или "дт" или "нативный" в данном контексте означают аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные варианты. Белок дикого типа, полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG, полинуклеотид, ДНК, РНК и т. п. имеют аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была намеренно модифицированной.

[0056] В некоторых вариантах реализации изобретения химерные белки МТИ по настоящему изобретению могут использовать линкерный домен. Линкерный домен используется с целью оперативного соединения домена МТИ с партнером по слиянию.

[0057] Термин "линкерный домен" относится к полипептидным линкерам, непептидным линкерам и их комбинациям. В частности, линкерный домен может представлять собой полипептид. В данном контексте термин "линкерный домен" относится к последовательности, которая соединяет два домена в линейной последовательности. В данном контексте термин "полипептидный линкер" относится к последовательности пептида или полипептида (например, синтетического пептида или последовательности

полипептида), которая соединяет два домена в линейной последовательности аминокислот полипептидной цепи. Например, полипептидные линкеры могут быть использованы для соединения домена МТИ с доменом Fc. Предпочтительно, такие полипептидные линкеры могут обеспечить гибкость молекулы полипептида. Химерный белок МТИ по настоящему изобретению может содержать линкерный домен, в том числе и пептидный линкер.

[0058] Например, линкерный домен может быть использован для соединения двух доменов в линейной аминокислотной последовательности полипептидного линкера, такой как связывающий домен МТИ с доменом Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения линкерный домен может быть использован для соединения домена МТИ с доменом Fc. Линкерный домен может быть использован для соединения доменов в любом порядке. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения линкер соединит домен МТИ и домен Fc в порядке МТИ-линкер-Fc, в то время как в других вариантах реализации изобретения линкер соединит домен МТИ и домен Fc в порядке Fc-линкер-МТИ, где полипептидные области обозначены от N-конца к С-концу. Примерные полипептидные линкеры включают те, которые состоят из остатков глицина и серина, так называемые Gly-Ser полипептидные линкеры. В данном контексте термин "Gly-Ser полипептидные линкеры" относится к пептиду, который состоит из остатков глицина и серина. Примерный Gly-Ser полипептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $\text{Ser}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n равен целому числу от 1 до 10, SEQ ID NO:33-42, соответственно. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=1$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=2$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=3$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=4$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=5$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=6$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=7$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=8$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=9$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=10$.

линкер(а), в котором $n=9$. В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ содержит один или два Gly-Ser полипептидный(х) линкер(а), в котором $n=10$.

[0059] Другой примерный линкер приведен в SEQ ID NO:43.

[0060] Термин "содержащий" означает, что соединение, то есть химерный белок, может содержать дополнительные аминокислоты на одном или обоих N- или C-концах. Конечно, эти дополнительные аминокислоты не должны оказывать существенного влияния на активность соединения, то есть химерного белка.

[0061] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметиков аминокислот, которые функционируют в некоторой степени аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также кодируемые аминокислоты, которые впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин и фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединению, то есть химерным белкам, которые имеют такую же основную химическую структуру как и встречающиеся в природе аминокислоты, то есть атом углерода, связанный с атомом водорода, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой. Аминокислотные аналоги имеют модифицированные R-группы или служат основой модифицированным пептидным каркасам, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты.

[0062] Термин "аминокислотная замена" означает замену по меньшей мере одного существующего аминокислотного остатка в предварительно определенной или нативной аминокислотной последовательности другой "замещенной" аминокислотой.

[0063] Термин "вставка аминокислоты" относится к вставке одной или более дополнительных аминокислот в предварительно определенную или нативную аминокислотную последовательность. Вставка может состоять из одного, двух, трех, четырех, пяти или до двадцати аминокислотных остатков.

[0064] Термин "делеция аминокислоты" относится к удалению по меньшей мере одной аминокислоты из предварительно определенной или нативной аминокислотной последовательности. Делеция может состоять из одного, двух, трех, четырех, пяти или до двадцати аминокислотных остатков.

[0065] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются равноправно в данном документе и относятся к полимеру аминокислотных остатков. Термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых одна или более аминокислота не является

природной аминокислотой, синтетической аминокислотой или миметиком аминокислоты.

[0066] Термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимерам в любой одноцепочечной или двухцепочечной форме. Термин "нуклеиновая кислота" используется взаимозаменяемо в отношении гена, нуклеотида, полинуклеотида, кДНК, ДНК и мРНК. Не считая специальные ограничения, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют схожие связующие способности, как и натуральная аминокислота. Не считая специальные ограничения, конкретная нуклеотидная последовательность также охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, те, которые содержат замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, также как и явно указанную последовательность.

[0067] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, которые могут быть немодифицированной РНК или ДНК или модифицированной РНК или ДНК. Например, полинуклеотиды могут состоять из одно- или двухцепочечных областей, смешанных одно- или двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотиды могут быть трехцепочечными областями, содержащими РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Модифицированные полинуклеотиды включают модифицированные основания, такие как тритилированные основания или необычные основания, такие как инозин. Различные модификации могут быть сделаны в РНК и ДНК, таким образом, полинуклеотид включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

[0068] Термин "производный" или "производное" относится к соединению, то есть химерному белку, которое имеют циклическую часть, например, сшитое между цистеиниловых остатков, соединению, то есть химерному белку, являющемуся сшитым, одна или более пептидных связей заменяется непептидной связью, или N-конец заменяется на NRR_1 , NRC(O)R_1 , NRC(O)OR_1 , NHC(O)NHR_1 , $\text{NRS(O)}_2\text{R}_2$, сукцинамид или другую группу, где R и R_1 являются определенными в данном документе, и/или C-конец заменяется на C(O)R_3 или NR_4R_5 , и соединению, то есть химерному белку, в котором аминокислотные компоненты модифицируют путем обработки агентами, способными реагировать с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками. R выбран из группы, состоящей из водорода и C_{1-6} алкила, R_1 выбран из группы, состоящей из водорода и C_{1-6} алкила, R_2 выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила, C_{3-8} циклоалкила, и необязательно замещенного фенила; R_3 выбран из группы, состоящей из водорода, C_{1-6} алкила и C_{3-8} циклоалкила; R_4 выбран из группы, состоящей из водорода и C_{1-6} алкила; R_5

выбран из группы, состоящей из водорода, C₁₋₆алкила и C₃₋₈ циклоалкила; или R₄ и R₅, взятые вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное насыщенное кольцо, необязательно содержащее 1 дополнительный кольцевой гетероатом, выбранный из группы, включающей N, O и S.

[0069] Термин “C₁₋₆ алкил” относится к прямой или разветвленной алкильной цепи от одного до шести атомов углерода.

[0070] Термин “C₃₋₈ циклоалкил” относится к моноциклическому или бициклическому, насыщенному или частично (но не полностью) ненасыщенному алкильному кольцу от трех до восьми атомов углерода, и включает циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил и тому подобное. Подразумевается, что термин включает бензоконденсированный цикlopентил и циклогексил.

[0071] Термин "необязательно замещенный фенил" относится к фенильной группе, необязательно замещенной 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из гало, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, циано и трифторметила.

[0072] ПОЛУЧЕНИЕ

[0073] Соединения, то есть химерные белки, по данному изобретению могут быть получены стандартными методами синтеза, технологиями рекомбинантной ДНК или другими способами получения пептидов и химерных белков. В примерном процессе домен чМТИ ковалентно связан с доменом Fc путем экспрессии конструкта ДНК, кодирующего домен МТИ и домен Fc и любой линкерный домен.

[0074] Предусмотрены альтернативные способы конструирования химерного белка МТИ. В некоторых вариантах реализации изобретения ориентация домена может быть изменена для конструирования молекулы Fc-МТИ или молекулы МТИ-Fc, или молекулы МТИ-Fc-МТИ, которая сохраняет связывание с FcRn и имеет активный домен МТИ.

[0075] В некоторых вариантах реализации изобретения химерные белки МТИ содержат домен дикого типа Fc, который может допустить прохождение химерным белком эндоцитоза после связывания с FcRn (неонатальный рецептор Fc). Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам получения описанных химерных белков МТИ. Эти способы охватывают культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую химерные белки МТИ по изобретению. Как будет понятно специалистам в данной области техники, это может быть осуществлено различными способами, в зависимости от природы химерного белка МТИ. В некоторых вариантах реализации химерный белок МТИ по изобретению производится и может быть выделен.

[0076] В общем, предоставлены нуклеиновые кислоты, которые кодируют химерный белок МТИ по изобретению. Такие полинуклеотиды кодируют для домена МТИ, партнера по слиянию и любого линкерного домена. Настоящее изобретение также охватывает олигонуклеотидные фрагменты, полученные из описанных полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот, комплементарных этим полинуклеотидам.

[0077] Полинуклеотиды могут быть в виде РНК или ДНК. Полинуклеотиды в виде ДНК, кДНК, геномной ДНК, аналогов нуклеиновых кислот и синтетических ДНК находятся в пределах настоящего изобретения. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и в случае одноцепочечной, может быть кодирующей (смысловой) цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, представленной в данном документе, или может иметь место другая кодирующая последовательность, которая в результате избыточности или дегенерации генетического кода кодирует те же полипептиды, что и ДНК, предоставленная в данном документе.

[0078] В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота(ы), кодирующая химерные белки МТИ по изобретению, содержится в экспрессирующих векторах, которые могут быть внехромосомными или предназначены для интеграции в геном клетки-хозяина, в которую он введен. Экспрессирующие векторы могут содержать любое количество соответствующих регуляторных последовательностей (в том числе, но без ограничений, транскрипционные и трансляционные управляющие последовательности, промоторы, сайты связывания рибосом, энхансеры, сайты инициации репликации, и т. д.) или другие компоненты (гены селекции и т. д.), каждый из которых является функционально связанным, как хорошо известно в данной области техники. В некоторых случаях используются две нуклеиновые кислоты и каждая помещается в разный экспрессионный вектор (например, тяжелая цепь в первый экспрессионный вектор, легкая цепь во второй экспрессионный вектор) или в качестве альтернативы они могут быть помещены в один и тот же экспрессионный вектор. Специалистам в данной области техники буде понятно, что конструкция экспрессионного вектора(ов), включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, уровень экспрессии желаемого белка и т. д.

[0079] В общем, нуклеиновые кислоты и/или экспрессии могут быть введены в подходящую клетку-хозяин для создания рекомбинантной клетки-хозяина с помощью любого способа, подходящего для клетки-хозяина, выбранного (например, трансформации, трансфекции, электропорации, инфицирования) таким образом, что молекула(ы) нуклеиновой кислоты функционально связаны с одним или более

элементами, контролирующими экспрессию (например, в векторе, в конструкте, созданном с помощью процессов в клетке, интегрированных в геном клетки-хозяина). Полученная рекомбинантная клетка-хозяин может поддерживаться в условиях, подходящих для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в подходящем, не являющимся человеком животном, в соответствующей культуральной среде с соответствующими солями, факторами роста, антибиотиками, пищевыми добавками и т. д.), в результате чего производятся кодируемый(е) полипептид(ы). В некоторых случаях тяжелые цепи производятся в одной клетке, а легкие цепи в другой.

[0080] Доступные в качестве хозяев клеточные линии млекопитающих известны в данной области техники и включают многие immortalized линии клеток, доступные от Американской коллекции типовых культур (ATCC), Манассас Виргиния, включая, но не ограничиваясь ими, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки НЕК 293, клетки NSO, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и большое количество других клеточных линий. Клетки, не относящиеся к млекопитающим, включают, но без ограничений, бактериальные, дрожжевые, клетки насекомых, растений и также могут быть использованы для экспрессии рекомбинантных антител. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела могут быть получены в трансгенных животных, таких как коровы или куры.

[0081] В варианте реализации химерные белки по изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью. Нуклеотидные последовательности по изобретению могут быть полезны для ряда применений, в том числе: клонирования, генной терапии, экспрессии и очистки белка, внесения мутации, ДНК-вакцинации хозяина, нуждающегося в этом, генерации антител для, например, пассивной иммунизации, ПЦР, генерации праймеров и зондов, конструирования и генерации миРНК и тому подобного. В варианте реализации нуклеотидная последовательность изобретения содержит, состоит или по существу состоит из нуклеиновой последовательности, выбранной из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12,

14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32.

[0082] В варианте реализации изобретения нуклеотидная последовательность включает нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичную нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32. В варианте реализации изобретения нуклеотидная последовательность включает непрерывную нуклеотидную

последовательность на по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичную непрерывной нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32.

[0083] Предпочтительные химерные белки МТИ по данному изобретению содержат последовательность (например, по меньшей мере один домен Fc), полученную из последовательности иммуноглобулина человека. Однако, последовательности могут содержать одну или более последовательностей из других видов млекопитающих. Например, домен Fc примата или домен нуклеазы могут быть включены в последовательность субъекта. В альтернативном варианте одна или более мышинных аминокислот могут присутствовать в полипептиде. В некоторых вариантах реализации полипептидные последовательности изобретения не являются иммуногенными и/или имеющими пониженную иммуногенность. Химерные белки МТИ по изобретению могут содержать консервативные аминокислотные замены в одном или более аминокислотных остатках, например, в незаменимых или заменимых аминокислотных остатках. Консервативная аминокислотная замена представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), полярные незаряженные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, остаток заменимой аминокислоты в связывающем полипептиде предпочтительно замещается другим аминокислотным остатком с боковой цепью того же семейства. В другом варианте реализации изобретения цепочка аминокислот может быть замещена структурно аналогичной цепочкой, отличающейся порядком и/или составом представителей одного семейства боковых цепей. В качестве альтернативы, в другом варианте реализации изобретения мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей кодирующей последовательности или ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные таким образом мутанты могут быть введены в связывающие полипептиды изобретения и скринированы на их способность связываться с желаемой целью.

[0084] ПРИМЕНЕНИЕ

[0085] В одном варианте реализации настоящее изобретение предлагает способы диагностики и лечения состояний, связанных с МТИ. Используемые в данном контексте термины "состояние", "расстройство" и "заболевание" относятся к любому нездоровому или ненормальному состоянию. Термин "связанные с МТИ состояния" включает условия, расстройства и заболевания, в которых МТИ обеспечивает терапевтический эффект. Термин "связанные с МТИ состояния" включает условия, характеризующиеся иммуномодулирующим или воспалительным действием. В частности, термин связанные с МТИ состояния включает панкреатит, включая острый панкреатит и хронический панкреатит, синдром системного воспалительного ответа, острую недостаточность кровообращения (например, вызванную шоком), диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и синдром полиорганной недостаточности. Термин связанные с МТИ состояния включает применение для пациентов, нуждающихся в хирургической помощи с высоким риском. Термин связанные с МТИ состояния включает инфекции легких, печени, сердца или почек. Термин связанные с МТИ состояния также включает тяжелый сепсис. Термин связанные с МТИ состояния также включает острое повреждение легких (ОПЛ), вызванное вирусами атипичной пневмонии или острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

[0086] В одном варианте реализации изобретение предлагает способы лечения состояний, связанных с МТИ, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества, например, фармацевтически эффективного количества, раскрытого химерного белка МТИ. В некоторых вариантах реализации изобретения состояние особо упоминается в настоящем документе.

[0087] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению получены способом, хорошо известным в данной фармацевтической области техники, и содержат по меньшей мере один химерный белок МТИ согласно изобретению в качестве активного компонента. Фармацевтическую композицию химерных белков МТИ, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, получают путем смешивания химерного белка МТИ, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" относится к тем веществам, которые, как правило, используются в приготовлении фармацевтических композиций и должны быть фармацевтически чистыми и нетоксичными в используемых количествах. Как правило, они представляют собой твердый, полутвердый или жидкий материал, который в совокупности может служить в качестве наполнителя или среды для активного

ингредиента. Некоторые примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences and the Handbook of Pharmaceutical Excipients, включая разбавители, наполнители, носители, матрицы с замедленным высвобождением, стабилизирующие агенты, консерванты, растворители, суспендирующие агенты, буферы, эмульгаторы, красители, пропелленты, покрывающие агенты и другие. В общем, для инъекции или внутривенного введения химерные белки МТИ по настоящему изобретению находятся в виде лиофилизированных составов или водных растворов.

[0088] Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества являются нетоксичными для субъектов в используемых количествах и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (приблизительно менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белка); и/или неионные поверхностно-активные вещества, например, TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0089] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также могут содержать более одного активного соединения, то есть химерного белка, требуемого при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополняющими видами активности, которые не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие молекулы присутствуют в надлежащей комбинации в количествах, которые эффективны для использования по назначению.

[0090] Фармацевтические композиции, которые будут использоваться для введения *in vivo* должны быть стерильными или почти стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

[0091] Химерные белки МТИ по изобретению вводятся субъекту, в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечной,

внутрибрюшинной, внутрицереброспинальной, подкожной, внутрисиновиальной, внутрисуставной или интратекальной инъекцией или инфузией или посредством местных или ингаляционных путей введения. Внутривенное или подкожное введение химерного белка МТИ является предпочтительным.

[0092] Термины “лечить”, “лечение” и “воздействие” включают улучшение условий, описанных в данном документе. Термины “лечить”, “лечение” и “воздействие” включают все процессы, обеспечивающие замедление, прерывание, задержку, контролирование или прекращение состояния, или прогрессирование условий, описанных в данном документе, но не обязательно указывает на полное устранение всех симптомов или излечение данного состояния. В данном контексте термины "лечить", "лечение" и "воздействие" предполагают включение терапевтического лечения таких расстройств. В данном контексте термины "лечить", "лечение" и "воздействие" предполагают включение профилактического лечения таких расстройств.

[0093] В данном контексте, термины "пациент" и “субъект” включают людей и животных, не являющихся человеком, например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, морские свинки, собаки, кошки, кролики, коровы, лошади, овцы, козы и свиньи. Данный термин также включает птиц, рыб, рептилий, амфибий и подобных. Понятно, что более конкретный пациент представляет собой человека. Кроме того, более конкретные пациенты и субъекты представляют собой не относящихся к человеку млекопитающих, таких как мыши, крысы и собаки.

[0094] Используемый в данном описании термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, то есть химерного белка по изобретению, который при однократном или многократном введении дозы лечит пациента, страдающего от указанного состояния. Эффективное количество может быть легко определено практикующим диагностом в виде медицинского специалиста, такого как врач или ветеринар, специалистом в данной области техники, с применением известных методов и путем наблюдения результатов, полученных в аналогичных обстоятельствах. Например, медицинский специалист может начать с доз лекарственного средства, используемого в фармацевтической композиции, уровень которых ниже, чем требуется для достижения желательного терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до достижения желательного эффекта.

[0095] При определении эффективного количества, дозы, практикующим диагностом рассматривается ряд факторов, в том числе, но без ограничений: вид больного; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное состояние, расстройство или заболевание; степень или поражение или тяжесть состояния, расстройства или

заболевания, реакцию отдельного пациента; конкретное вводимое соединение, то есть химерный белок; способ введения; характеристики биодоступности вводимого лекарственного средства; выбранную схему приема; применение сопутствующих медикаментов; а также другие обстоятельства, имеющие значение. Конкретные количества могут быть определены специалистом в данной области. Несмотря на то, что эти дозы основаны на среднем человеческом субъекте, имеющим массу от около 60 кг до около 70 кг, врач сможет определить соответствующую дозу для пациента (например, ребенка), где масса выходит за пределы этого диапазона веса.

[0096] Схемы дозирования подобраны для обеспечения желаемого ответа. Так, например, может быть введена одноразовая доза, в динамике могут быть введены несколько отдельных доз, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как указывается остротой терапевтической ситуации.

[0097] Парентеральные композиции могут быть сформулированы в разовой дозированной форме для простоты введения и однородности дозы. Разовая дозированная форма в данном контексте относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит определенное количество активного соединения, то есть химерного белка, рассчитанное для обеспечения заданного терапевтического эффекта, в сочетании с заданным фармацевтическим носителем.

[0098] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно формулируют в виде разовой дозированной формы, каждая доза, как правило, содержит от 0,5 мг до около 100 мг химерного белка МТИ по изобретению. Термин “разовая дозированная форма” относится к физически дискретной единице, содержащей определенное количество активного ингредиента в сочетании с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом, с помощью которого одна или более форма используется на протяжении всего режима дозирования для получения желаемого терапевтического эффекта. Одна или более “разовая дозированная форма” могут быть приняты, чтобы повлиять на дозировку лечения.

[0099] Примерный, не ограничивающий диапазон для эффективного количества химерного белка МТИ, используемого в настоящем изобретении, составляет около 0,1-100 мг/кг, например, около 0,1-50 мг/кг, например, около 0,1-20 мг/кг, например, около 0,1-10 мг/кг, например, около 0,5 мг/кг, например, около 0,3 мг/кг, около 1 мг/кг или около 3 мг/кг. В другом варианте реализации изобретения химерный белок МТИ вводится в дозе 1 мг/кг или более, например, в дозе от 1 до 20 мг/кг, например, в дозе от 5 до 20 мг/кг, например, в дозе 8 мг/кг. Примерный, не ограничивающий диапазон для

эффективного количества химерного белка МТИ, используемого в настоящем изобретении, составляет около 1-500 мг/доза, например, около 1-100 мг/доза, например, около 1-50 мг/доза, например, около 1-10 мг/доза, например, около 1 мг/доза, или около 3 мг/доза, или около 5 мг/доза.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок МТИ вводится путем инфузии каждые 3 дня или еженедельной дозой от 10 до 500 мг/дозу. Такое введение может быть повторено по мере необходимости для поддержания желаемого терапевтического эффекта.

[0100] В качестве неограничивающих примеров, лечение в соответствии с настоящим изобретением может быть обеспечено дозировкой химерного белка МТИ в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 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, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в день, по крайней мере, один из дней; 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 или 40 мг/кг, или в качестве альтернативы по меньшей мере один раз в неделю 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг после начала лечения, или в любой их комбинации. В качестве неограничивающих примеров лечение в соответствии с настоящим изобретением может быть обеспечено дозировкой химерного белка МТИ в количестве около 1-100 мг/доза, например 1, 5, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 150, 200, 250, 300, 350 или 400 мг/доза. По крайней мере один раз в день 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 или 40 мг/доза после начала лечения, или в любой их комбинации. По крайней мере в одной из недель 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/доза после начала лечения, или в любой их комбинации.

[0101] Химерные белки МТИ по изобретению находят применение в различных областях использования, включая лечение заболеваний, связанных с МТИ. Химерные белки МТИ по изобретению могут найти применение при лечении заболеваний с вовлечением иммунной системы, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, послеоперационных воспалительных реакций, ассоциированных с лизосомой заболеваний, заболеваний свертываемости крови, заболеваний, связанных с протеазами и в качестве вспомогательной терапии во время операции.

Химерные белки МТИ по изобретению могут найти применение при лечении панкреатита (включая индуцированный эндоскопией панкреатит и острый панкреатит), артрита, атипичной пневмонии, синдрома системного воспалительного ответа, острой недостаточности кровообращения, сепсиса, гепатита, аппендицита, колита, отказа органа,

повреждения органа (в том числе поджелудочной железы, почек, легких), реперфузионного повреждения, синдрома Стивенса-Джонсона, токсического эпидермального некролиза, шока, ишемической травмы, острого повреждения легких (в том числе, вызванного острым расслоением аорты), астмы, воспаления легких, пневмонии (в том числе пневмонии, спровоцированной искусственной вентиляцией легких), диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и синдрома системного воспалительного ответа.

[0102] Химерные белки МТИ по настоящему изобретению могут найти применение при ингибировании протеаз, в том числе сериновых протеаз, в том числе, трипсина, химотрипсина, тромбина, калликреина, плазмина, эластазы, катепсина, липазы, гиалуронидазы, факторов IXa, Xa, XIa и XIIa, и эластазы полиморфноядерных лейкоцитов.

[0103] Химерные белки МТИ по настоящему изобретению могут найти применение в подавлении провоспалительных медиаторов, таких как цитокины, альфа-фактор некроза опухоли, интерлейкин-1, -1β , -4, -6 и -8, -10 и хемокины.

[0104] Химерные белки МТИ по настоящему изобретению могут найти применение в лечении рака, в том числе предотвращении инвазии опухоли и метастазировании, изменении темпов апоптоза, а также снижении потери функции почек при лечении цисплатином.

[0105] Химерные белки МТИ по настоящему изобретению могут найти применение для лечения СПИДа, в том числе и в качестве дополнительного лечения.

[0106] ПРИМЕРЫ

[0107] Ниже приведены примеры конкретных вариантов реализации настоящего изобретения. Примеры представлены только с иллюстративными целями и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т. д.), но, конечно, некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны допускаться. При практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные методы химии белков, биохимии, технологии рекомбинантной ДНК и фармакологии, соответствующих данной области техники. Такие технологии подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993 год); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Инк.); Sambrook, соавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е издание, 1989 год); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan ред., Academic Press, Инк.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18-

издание (Истон, Пенсильвания: Mack Publishing Company, 1990 год); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3-изд. (Plenum Press) Vols A and B (1992 год).

[0108] ПРИМЕР 1: Конструирование векторов ДНК, кодирующих химерные белки МТИ.

[0109] Методы осуществления молекулярной биологии известны в данной области техники и их можно найти, например, в Molecular Cloning: A laboratory Manual 4-е издание (Micheal Green and Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Press, 2012 год).

[0110] Ген, кодирующий МТИ-Fc1, был заказан с использованием сервиса генного синтеза GeneArt с оптимизированными кодонами из компании Лайф Текнолоджис (Карлсбад, Калифорния). Последовательность белка, как указано в SEQ ID NO: 1 с сигнальным пептидом, MGWSCILFLVATATGVHS, добавленным для секреции. Фигура 1 иллюстрирует общие области МТИ, используемые в слиянии. Ген, кодирующий МТИ-Fc1, лигировался в экспрессионный вектор млекопитающих. Экспрессионные векторы млекопитающих, известны в данной области техники, включая векторы pSecTag2/Hygro A, pcDNA4 и pcDNA6 (Лайф Текнолоджис, Карлсбад, штат Калифорния). Вектор расщепляли ферментами рестрикции Hind III-HF и EcoRI от Нью Инглэнд Биолабс (NEB). Этот фрагмент лигировался в вектор экспрессии, который обеспечивает стойкость к карбенициллину, и был расщеплен теми же двумя ферментами рестрикции. Вектор: в лигировании было использовано молярное соотношение 1:3. Лигированная ДНК трансформировалась в 10-бета химически компетентные клетки *E. coli* из NEB, и высевалась на планшетах ЛБ-карбенициллин для роста в течение ночи. Колонии выращиваются в течение ночи на ЛБ с карбенициллином, и минипрепаративная ДНК получается с использованием набора Qiagen's QIAprep Spin Miniprep (Кайаген, Хильден, Германия). Затем ДНК секвенируется с использованием сервиса по секвенированию ДНК от Bio Applied Technologies Joint (BATJ, Сан-Диего). Колония с проверенной последовательностью проверялась, затем выращивались в ЛБ среде с карбенициллином для очистки ДНК с инструментом BenchPro 2100 и MaxiCard от Лайф Текнолоджис.

[0111] ПРИМЕР 2: Конструирование векторов ДНК, кодирующих варианты химерных белков МТИ-Fc.

[0112] Список SEQ ID NO:1-28 ДНК и белковых последовательностей некоторых химерных белков МТИ-Fc. Такие химерные белки МТИ содержат модификации, которые изменяют изотип Ig, линкеры, домен МТИ, порядок домена МТИ и Fc (N- или C-концевой), виды МТИ, виды Fc, старт/стоп остатки МТИ, присоединение сахара, сайты чувствительности к протеазе и эффекторную функцию Fc. Некоторые белки МТИ-Fc изображены на Фигурах 2 и 3. Химерные белки МТИ-Fc, содержащие три

аминокислотные модификации в Ser (IgG1 Fc3Ser, C154S/P172S/P265S) содержат мутации, меняющие образование дисульфидной связи и функции FcγR.

[0113] Создание экспрессирующих конструкций МТИ-Fc

[0114] Нуклеотидные последовательности МТИ (например, дикого типа, S10A и варианты K21S K22S) и человеческие домены Fc3Ser были кодон-оптимизированы для экспрессии клетками CHO и синтезированы с помощью Лайф Технолоджис (Карлсбад, Калифорния). Следующие конструкции были созданы в экспрессионном векторе CHO путем сборки доменов МТИ и Fc3Ser с помощью способа клонирования без лигазы и последовательности (sequence and ligation-independent cloning (SLIC)) (Li и Elledge 2007 год Nature Methods 4(3): ст. 251-256): МТИ-Fc3Ser, МТИ S10A-Fc3Ser, МТИ K21S K22S-Fc3Ser, МТИ m2-Fc3Ser, МТИ L1-Fc3Ser, МТИ L2-Fc3Ser (Фигура 4А). Сборка ДНК на основе SLIC была осуществлена путем смешивания продуктов ПЦР линейаризованного вектора (30 нг), МТИ (100 нг) и Fc3Ser (100 нг) с соответствующими "липкими" последовательностями для гомологичной рекомбинации и Т4 ДНК-полимеразой (0,5 U) в объеме 5 мкл содержащий NEBuffer 2 и БСА (Нью Инглэнд Биолабс). После 30 минутной инкубации при комнатной температуре, экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы Т4 прекращалась добавлением 2 мМ дЦТФ. Затем была сделана гомологичная рекомбинация *in vitro* с помощью температурного перепада от 75С до 37С в течение 30 минут. Реакционная смесь, содержащая собранную ДНК, была химически преобразована в TOP10 E. coli (Инвитроген) и высеяна на ЛБ-агар, содержащий карбенициллин. Открытые рамки считывания для остальных конструкций (МТИ m1-Fc3Ser, МТИ d1-Fc3Ser, МТИ d2-Fc3Ser, МТИ L3-Fc3Ser, МТИ-Fc IgG2, Fc3Ser-МТИ и мышинных МТИ-мышь IgG1) были кодон-оптимизированы и синтезированы в виде химерных конструкций. Эти конструкции были клонированы в экспрессионном векторе с использованием метода SLIC, как описано выше (Фигура 4Б). Последовательности ДНК всех 13 конструкций в векторе были проверены секвенированием ДНК по Сэнгеру.

[0115] ПРИМЕР 3 Экспрессия слияний МТИ-Fc в клетках CHO.

[0116] ДНК-вектор, кодирующий МТИ-Fc1, стабильно трансфицировался в клетки CHO-S с использованием Инвитроген Freestyle MAX Reagent. Смешанные культуры высевались в Т-колбы и отбирались с использованием CD CHO, дополненных различными концентрациями метионин сульфоксимины (MSX) в диапазоне от 50-100 мкМ. После того, как культуры были восстановлены после отбора, они были размножены для производства и криоконсервации. Многочисленные партии продукции были сделаны для поддержания тестирования *in vitro* и *in vivo*. Производственный процесс составляет 10-14 дней подпитываемой культуры с использованием CD FortiCHO, CD Efficient Feed B и CD

Efficient Feed C от Инвитроген. Объемы производства варьировались от 1 литра до 3 литров, и культуры собирались центрифугированием при 3500 оборотах в минуту в течение 1-2 часов с последующей стерильной фильтрацией супернатанта и полученный клеточный супернатант использовался в очистке.

[0117] ПРИМЕР 4: Очистка химерных белков МТИ-Fc.

[0118] Очистка 2-х партий МТИ-Fc1 была сделана путем использования 2,3 литров кондиционированной среды клеток CHO с экспрессированным МТИ-Fc1 с 30 мл мАт белка А выбранным 1х (ДжиИ Хэлскеа), уравновешенной в 25мМ тринатрийцитрата pH 8,1, 125 мМ NaCl. Колонку промывали 2-мя объемами колонки (60 мл) 25 мМ тринатрийцитрата pH 8,1, 125 мМ NaCl, а затем 2-мя объемами колонки (60 мл) 25 мМ тринатрийцитрата pH 8,1, 2000 мМ NaCl. Затем колонка уравнивалась 2-мя объемами колонки (60 мл) 25 мМ тринатрийцитрата pH 8,1, 125 мМ NaCl. МТИ-Fc1 элюировался 7-мью объемами колонки (210 мл) градиентом до 100 % pH 25 мМ лимонной кислоты pH 2,9, 125 мМ NaCl. МТИ-Fc1 элюировался в виде двух пиков, широкого, фланкирующего пика при приблизительном pH 5,5 и более резкого пика при приблизительном pH 3,5. Затем концентрированный МТИ-Fc был заменен буфером в конечный буфер TBS, pH 7,4 (25 мМ Трис, 130 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4) с использованием концентрирующих центрифуг Амикон Ультра с 30К М.В.С.О. Очищенные выходы белка показаны в ТАБЛИЦЕ 1, белок хранится при -80°C для дальнейшего использования.

ТАБЛИЦА 1

Название пика	Объем пика (мл)	Конечный продукт конц. (мг/мл)	Конечный продукт Выход (мг)	Колонка Белка А Выход (%)	% от полной загрузки белка
Пик 1-й партии	40	10	110	59	52
Пик 2-й партии	40	11	150	72	68

[0119] ПРИМЕР 5: Экспрессия и очистка дополнительных химерных белков МТИ-Fc.

[0120] В день трансфекции CHO клетки были подсчитаны и посеяны с плотностью $2,2 \times 10^6$ живых клеток/мл в 90 % от общего объема - 900 мл и выращены во встряхиваемых колбах при температуре 33 °C до трансфекции. Замороженная ДНК размораживалась и добавлялась к ПЭИ (Полиэтиленимин- катионный полимер) и АКТ. ДНК добавлялась на уровне 0,625 мкг/1 млн клеток. Для 1 л клеток необходимо 1,25 мг.

90 % от общей добавленной ДНК представляет собой интересующую ДНК = 1,125 мг. Оставшиеся 10 % составлял АКТ (кодирует антиапоптозный белок) = 0,125 мг. ПЭИ добавляется на уровне 2,5 мкг/1 миллион клеток. Для 1 л трансфекции это составляло 5 мг. Раствор ПЭИ добавляется к разбавленной ДНК и инкубируется при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением комплекса ДНК в клетки.

[0121] Культуры выращиваются при 33 °С, 5 % CO₂ и 125 об/мин. От 1 до 4 часов после трансфекции добавляется 0,6 mM вальпроевой кислоты. Для трансфекции 1 л это составляло 2 мл 300 mM стока. На 1-й день добавлялось 1:250 антиагрегационного агента, то есть 4 мл /1 л и 15 % об/об CD Efficient Feed C, то есть 150 мл/1 л. На 5-й день и 9-й день добавлялось 15 % CD Efficient Feed C.

[0122] Супернатанты клеток собирались на 14-й день, клетки подсчитывались и определялись белковые титры. Клетки осаждались центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут при температуре 4°C. Супернатанты фильтровались через 0,2 мкм фильтр и сохранялись при 4°C или в замороженном состоянии при -20°C.

[0123] Очистка химерных МТИ-Fc была сделана с помощью хроматографии Белка А. 200 мл супернатанта культуры клеток смешивались с 2 мл из гранул сефарозы с MabSelect Sure Белком А и встряхивались в течение ночи при температуре 4°C. Смесь гранул затем центрифугировалась в пробирках на 50 мл при 1200 об/мин в течение 5 минут, и супернатант удалялся. Гранулы помещают в колонку и промывают трижды буфером для связывания (Био Рад, Геркулес, Калифорния). Слияния МТИ элюировались с 8 мл MAPS II буфера для элюции (Био Рад, Геркулес, Калифорния). Добавлялись 2 мл раствора нейтрализации (1 М Трис-НCl, pH 8). Затем образцы были заменены буфером на 25 mM цитрат, 125 mM NaCl, pH 5,5 путем многократного концентрирования и разбавления буфера с использованием форм Амикон Центрифужал (30MWCO, 15 мл, Millipore). На Фигуре 9 приведены результаты очисток различных химерных белков МТИ.

[0124] ПРИМЕР 6: Ингибирование протеаз с помощью химерных белков МТИ

[0125] In vitro ферментативный Анализ на Ингибирование Трипсина с помощью химерного белка МТИ-Fc

[0126] Растворы МТИ-Fc1 при различных концентрациях (≤ 200 nM конечная концентрация) готовятся в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ и 0,01 % Brij L23, pH 7,4. Анализы активности проводятся в 384-луночных планшетах Greiner с ячейками уменьшенного объема. Все этапы проводятся при температуре окружающей среды.

[0127] Человеческий панкреатический трипсин (конечная концентрация 1,5 nM) (Афенс Ресерч энд Текнолоджи, Инк) добавлялся к растворам, затем предварительно инкубировался с тестируемым МТИ-Fc в течение 15 минут. Далее иницировалась

реакция с 100 мкМ (конечная) субстрата N-бензоил-L-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин гидрохлорида SIGMA B7260-25MG. Общий объем реакционной смеси составлял 20 л. Активность трипсина определялась с помощью флуоресценции. Например, интенсивность флуоресценции определялась в кинетическом режиме над окном от 30 до 60 минут на BMG PHERAstar FS или PHERAstar plus с использованием длины волны возбуждения 370 нм и длины волны эмиссии 470 нм. Активность трипсина являлась линейно пропорциональной к изменению наблюдаемой флуоресценции (конечная - начальная). Процент ингибирования трипсина при данной концентрации МТИ-Fc был определен следующим образом:

[0128] Процент ингибирования = $100 * (1 - ((F_i - F_p) / (F_n - F_p)))$

[0129] Где: F_i представляет собой наблюдаемую флуоресценцию при данной концентрации тестируемого МТИ-Fc.

[0130] F_p представляет собой наблюдаемую флуоресценцию положительного контроля, то есть среднее значение от 2 до 6 анализов при отсутствии Трипсина.

[0131] F_n представляет собой наблюдаемую флуоресценцию отрицательного контроля, то есть среднее значение от 2 до 6 анализов Трипсина в присутствии только наполнителя.

[0132] ИК50 (молярная концентрация соединения, то есть химерный белок, который вызывает 50 %-ное ингибирование) испытуемого соединения, то есть химерного белка, рассчитывалась с помощью уравнения нелинейной аппроксимации кривой по методу наименьших квадратов Процент ингибирования = $\text{Низ} + ((\text{Верх} - \text{Низ}) / (1 + ((\text{ИК50} / [\text{МТИ-Fc}])^{\text{Холм}})))$. Внутри панели МТИ-Fc был включен один положительный контроль. Как показано на Фигуре 5, человеческий МТИ имеет ИК50 ~3 нМ.

[0133] Измерение ингибирования других протеаз с помощью МТИ-Fc1 также измерялось в Реакшн Байолоджи Корпорейшн (Малверн, Пенсильвания). Фигура 6 иллюстрирует МТИ-Fc1 ингибирование химотрипсина. На Фигуре 7 приведены ингибирующие константы МТИ-Fc1 для различных протеаз. МТИ-Fc1 умеренно ингибирует химотрипсин и плазмин и демонстрирует слабое ингибирование каспазы-1, катепсина С и папаина.

[0134] ПРИМЕР 7: Клеточные эффекты лечения химерными белками МТИ

[0135] Ингибирование МТИ-Fc1 высвобождения цитокинов измерялось в клеточном анализе. Клетки BEAS2B высевались с плотностью 20,000 клеток/лунка в 96-луночный планшет и культивировались с использованием набора BEGM Bullet (Лонза) в CO₂-инкубаторе. Через 24 часа культуральная среда заменялась обычной средой DMEM для голодания и клетки культивировались в течение ночи. Затем клетки инкубировались в свежей плоской DMEM, содержащей 100нМ трипсина с различными концентрациями МТИ мочи человека или рекомбинантных МТИ-Fc1 белков. Через 8 часов собирались

культуральные супернатанты, и уровни белка ИЛ-6 оценивались с использованием человеческого ИЛ-6 DuoSet (Ар энд Ди Системс).

[0136] Результаты показывают, что оба МТИ и МТИ-Fc уменьшали трипсин-индуцированную выработку ИЛ-6 в клетках BEAS2B. Как проиллюстрировано на Фигуре 8, ингибирование было дозозависимым от значений ИК50 0,40 и 0,41 мкг/мл, соответственно.

[0137] ПРИМЕР 8

[0138] Измерения стабильности молекул МТИ-Fc - Тепловая денатурация

[0139] Эксперименты проводились с целью определения термостабильности и стабильности в режиме реального времени. Все молекулы демонстрировали активность в ингибировании трипсина. Термостабильность измерялась с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии на калориметре Microcal VP-DSC. Образцы готовились в концентрации 1 мг/мл и буферизировались в 0,25 мМ Трис pH 7,4, 0,13 М NaCl и 0,0027 М KCl. Образцы нагревались от 25°C до 110°C со скоростью 200°C в час. МТИ-Fc1 сравнивались с Номером Публикации Заявки CN 103044554 A, SEQ ID 2 и 6, который содержит IgG2 или домен Fc IgG1, соответственно. Результаты представлены в Таблице 8.

ТАБЛИЦА 8

Белок	ДСК Tm1 (oC)	ДСК Tm2 (oC)
МТИ-Fc1 (SEQ ID NO:1)	70,86	85,79
CN 103044554 A SEQ ID 6	68,72	86,38
CN 103044554 A SEQ ID 2	68,47	79,22

ПРИМЕР 9

[0140] Измерение стабильности в режиме реального времени

[0141] Измерение стабильности в реальном времени проводилось путем инкубирования SEQ ID NO:1 (МТИ-Fc1) или CN 103044554 A, SEQ IDS 2 или 6 при температуре 2-8°C и 40°C в течение 0, 2 и 4 недель в буфере TBS, pH 7,4. Формирование высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений определялось с помощью вытеснительной хроматографии (SEC) и визуализировалось с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрация каждого МТИ-Fc также контролировалась путем определения оптической плотности раствора при 280 нм (A280), с использованием коэффициентов экстинкции определяемых составом белка. При анализе с помощью SEC молекулы МТИ-Fc производят два частично перекрывающихся пика. Площадь пика в процентах в каждом образце МТИ-Fc, измеренная с помощью SEC, приведена в Таблице 9 в момент времени = 0 недель, 2 недели и 4 недели. Также показано

процентное изменение концентрации, измеренное при A280 (% Δ (мг/мл)) в момент времени = 2 недели и 4 недели. Начальная концентрация T0 каждого образца составляла МТИ-Fc1 = 33,5 мг/мл, CN 103044554 SEQ ID NO:2 = 8,5 мг/мл и CN 103044554 SEQ ID NO:6 = 5,6 мг/мл. Изменчивость 3 % является характерной для SEC и 15 % для отдельных измерений УФ. Анализ ПААГ показал, что каждая молекула МТИ-Fc демонстрирует спектр компонентов, ожидаемый для полноразмерного МТИ-Fc.

ТАБЛИЦА 9.

Белок	SEC 0 недель	SEC 2 недели	SEC 4 недели	% Δ (мг/мл) 2 недели	% Δ (мг/мл) 4 недели
МТИ-Fc1 (SEQ ID NO:1)	Пик1 35,7 % Пик2 64,3 %	Нет данных		Нет данных	Нет данных
МТИ-Fc1 (SEQ ID NO:1) при 2-8°C	Нет данных	Пик1 36,2 % Пик2 63,8 %	Пик1 36,1 % Пик2 63,9 %	9,2 %	1,2 %
МТИ-Fc1 (SEQ ID NO:1) при 40°C	Нет данных	Пик1 37,1 % Пик2 62,9 %	Пик1 36,8 % Пик2 63,2 %	0,2 %	11,9 %
CN 103044554 A SEQ ID 2	Пик1 30,6 % Пик2 69,4 %	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CN 103044554 A SEQ ID 2 при 2-8°C	Нет данных	Пик1 29,0 % Пик2 71,0 %	Пик1 31,5 % Пик2 68,5 %	0,2 %	2,7 %
CN 103044554 A SEQ ID 2 при 40°C	Нет данных	Пик1 28,2 % Пик2 71,8 %	Пик1 30,3 % Пик2 69,7 %	1,6 %	3,5 %

CN 103044554 A SEQ ID 6	Пик 1 36,6 % Пик 2 63,4 %	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
CN 103044554 A SEQ ID 6 при 2-8°C	Нет данных	Пик1 34,8 % Пик2 65,2 %	Пик1 36,4 % Пик2 63,6 %	7,8 %	9,5 %
CN 103044554 A SEQ ID 6 при 40°C	Нет данных	Пик1 33,9 % Пик2 66,1 %	Пик1 34,5 % Пик2 65,5 %	3,6 %	6,0 %

ПРИМЕР 10.

[0142] Тестирование ингибирования комплемента *in vivo*.

[0143] Воздействие МТИ-Fc1 (SEQ ID NO:1) на систему комплемента было измерено *in vivo*. Самки мышей C3h/HeJ были приобретены у компании Jackson Laboratories. Животным вводили дозу в соответствии со схемой опыта Таблицы 10. Животным делалась в/б инъекция (100 мкл/мышь) по истечении 15 минут после введения дозы с ЛПС в нулевой момент времени. Животные были умерщвлены передозировкой CO₂ по истечении 2-х и 4-х часов после инъекции ЛПС, кровь собиралась путем пункции сердца. Кровь переносилась в микропробирку для отделения сыворотки и оставлялась для свертывания при комнатной температуре в течение 30 минут. Впоследствии микропробирки центрифугировались при 12000 об/мин в течение 5 минут, сыворотка удалялась и аликвотировалась в 96-луночный планшет. В качестве позитивного контроля использовалось 3 мг/мл розмариновой кислоты в физиологическом растворе. 96-луночный планшет замораживался при -20°C. Образцы сыворотки анализировались на содержание C5a с помощью duoset. Статистическая значимость определялась с использованием графического программного обеспечения Prism, воздействия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Как проиллюстрировано на Фигуре 10, SEQ ID NO:1 (МТИ-Fc1) значительно снижает C5a при дозе 20, 50 и 100 мг/кг через 4 часа после введения ЛПС.

ТАБЛИЦА 10: Схема опыта (МТИ-Fc1 представляет собой SEQ ID:1)

Группа	Описание	Доза (мг/кг)	Конц. (мг/мл)	Объем (мл/кг)	Способ ЛПС	Стимулирование ЛПС (в/б)	ЛПС конц.	Животные
--------	----------	-----------------	------------------	------------------	---------------	-----------------------------	--------------	----------

				введения			(мг/мл)	
1	интактный							8
2	Veh -2 ч	--	--	10	в/в	30 мкг	0,3	8
3	МТИ-Fc1 -2 ч	50	5,0	10	в/в	30 мкг	0,3	8
4	Ros_2 ч_30мг/кг массы тела	30	3,0	10	п/к	30 мкг	0,3	8
5	Veh – 4 ч	--	--	10	в/в	30 мкг	0,3	8
6	МТИ-Fc1 -4 ч_5мг/кг массы тела	5	0,5	10	в/в	30 мкг	0,3	8
7	МТИ-Fc1 -4 ч_20мг/кг массы тела	20	2,0	10	в/в	30 мкг	0,3	8
8	МТИ-Fc1 -4 ч_50мг/кг массы тела	50	5,0	10	в/в	30 мкг	0,3	8
9	МТИ-Fc1 -4 ч_100мг/кг массы тела	100	10,0	10	в/в	30 мкг	0,3	8
10	Ros_4 ч_30мг/кг массы тела	30	3,0	10	п/к	30 мкг	0,3	8

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 МТИ-Fc 1 Последовательность Белка

AVLPQEEEGSGGGQLVTEVTKKEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYG
GCMGNGNNFVTEKECLQTCRTVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGGC
QGNGNKFYSEKECREYCGVPGDGDEELLGSGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:2 МТИ-Fc 1 Последовательность ДНК

GCTGTGCTGCCTCAGGAAGAGGAAGGCTCTGGCGGAGGCCAGCTCGTGACCGAAGT
GACCAAGAAAGAGGACTCCTGCCAGCTGGGCTACTCTGCCGGCCCTTGTATGGGCA

TGACCTCCCGGTACTTCTACAACGGCACCTCCATGGCCTGCGAGACATTCCAGTACG
 GCGGCTGCATGGGCAACGGCAACAACCTTTGTGACAGAGAAAGAGTGCCTGCAGACC
 TGCAGAACCGTGGCCGCCTGTAACTGCCTATCGTGCGGGGACCCTGTCGGGCCTTT
 ATCCAGCTGTGGGCCTTCGACGCCGTGAAGGGCAAATGCGTGCTGTTCCCCTATGGC
 GGCTGCCAGGGAAATGGAAACAAGTTCTACTCCGAGAAAGAATGCCGCGAGTACTG
 TGGCGTGCCAGGCGACGGGGATGAGGAACTGCTGGGATCAGGCGGCGGAGGCGAC
 AAGACCCATACCTGTCCACCTTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGACCTTCTGTG
 TTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTG
 ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACA
 ACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG
 GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCC
 TAGCCGGGAAGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGAT
 TCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC
 TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAG
 CTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATG
 CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

SEQ ID NO:3 МТИ-Fc IgG1 3Ser Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsrlyfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtervaacnlpi
 vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkfysekecreycgvpdgdellrepkssdkthtppcpapellgssvflfpp
 kpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpa
 siektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkfypsdiavewesngqpennyktppldsdgsfflyskltvdksrwq
 qgnvfscsvmhealhnhytqkslspsg

SEQ ID NO:4 МТИ-Fc IgG1 3Ser Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaaggactcctgccagctgggct
 actctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggtgcatg
 ggcaacggcaacaactttgtacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggcgcctgtaacctgcctatcgtcgggggacc
 ctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaaggggcaaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaaatggaaac
 aagttctactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaatcttcga
 caagaccatacctgtccaccttgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctga
 tgatctcccggaacctgaagtgcctgcgtggtggtgatgtgtccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgt
 ggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccag
 gattggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagg

ccagccccgggaaccccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagg
gattctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccg
acggctcattctctgtactccaagctgacagtggaacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctctgctcgtgatgcacgagggc
ctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:5 МТИ-Fc IgG2 Ser Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsrlyfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtcrtvaacnlpi
vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcgngnkfysekecreycgvpdgdellrkscvecppcpappvagpsvflfppkpkd
tlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgmevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiekt
isktkgpprepqvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttpmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnv
fscsvmhealhnhytqkslslspgk

SEQ ID NO:6 МТИ-Fc IgG2 Ser Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaagaggactcctgccagctgggct
actctgccggccctgtatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggtgcatg
ggcaacggcaacaactttgtacagagaaagagtgctgcgacacctgcagaacctggccgcctgtaacctgcctatcgtcgggggacc
ctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaaggggcaaatgctgtgctgttcccctatggcggctgccagggaaatggaaac
aagttctactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcggaaatcctgtgtcgagtgc
ccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacctctg
aggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcatggagggtcataatgcc
aagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaa
ggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaacca
cagggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggtcttacctccagcga
catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttctctct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccacta
cacacagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:7 МТИ-Fc IgG2 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsrlyfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtcrtvaacnlpi
vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcgngnkfysekecreycgvpdgdellrkccvecppcpappvagpsvflfppkpkd
tlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgmevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiekt
isktkgpprepqvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttpmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnv
fscsvmhealhnhytqkslslspgk

SEQ ID NO:8 МТИ UTI-Fc IgG2 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaagaggactcctgccagctgggct
actctgccggccctgtatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggtgcatg

ggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggacc
ctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggcaaatgcgtgctgtcccctatggcggctgccagggaatggaaac
aagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcggaaatgttgtcgtgagtg
ccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttcttcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctccggacctctg
aggtcacgtgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttaactgggtacgtggacggcatggaggtgcataatgcc
aagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaa
ggagtacaagtgcgaaggtctcaacaaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctcaaaaacaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaggcttctacccagcga
catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccacta
cacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:9 МТИ-Fc IgG1 3Ser S10A Последовательность белка

avlpqeeegagggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtcrtvaacnlpi
vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkfysekecreycgvpdgdellrepkssdkthtppcpapellgssvflfpp
kpkdtlmisrtpcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpa
siektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvslclvkfypsdiavewesngqpennyktpvpldsdgsfflyskltvdksrwq
qgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:10 МТИ-Fc IgG1 3Ser S10A Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggcgagggcaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaaggactcctgccagctgggc
tactctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggctgcat
gggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggac
cctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggcaaatgcgtgctgtcccctatggcggctgccagggaatggaaa
caagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaaatcttcg
acaagaccataacctgtccaccttgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctg
atgatctccggacctgaagtacctgcgtggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagtcaattgttacgtggacggcg
tggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccag
gattggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggg
ccagccccgggaaccccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagg
gattctacccctccgatatcgccgtggaatgggagtgccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccg
acggctcatttctctgtactccaagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctctgctccgtgatgcacgaggcc
ctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:11 МТИ-Fc IgG1 3Ser m2 Последовательность белка

edscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfgyggcmgnnnfvtekeclqtcrtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvl
 fpyggcqnknkfysekecreycgvpgdgdellrepkssdkthtppcpapellggssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvsh
 edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasieltiskakgqprepvytlpps
 reemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhlealhnhytqksl
 slspg

SEQ ID NO:12 МТИ-Fc IgG1 3Ser m2 Последовательность ДНК

gaggactcctgccagctgggctactctgccggccttgatgggcatgacctccgggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgaga
 cattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgta
 acctgcctatcgtgcggggacctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttcccctatggc
 ggctgccagggaatggaaacaagttctactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgct
 gcgaggagcccaaatcttcgacaagaccataacctgtccacctgcccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccc
 caaagcccaaggacacctgatgatctccggaccttgaagtacgtcggtggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagt
 tcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaaacagtacaactccacctaccgggtggtgtcc
 gtgctgacctgctgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaag
 accatctcaaggccaaggccagccccgggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgt
 cctgacctgtctcgtgaagggtattctacctccgatatgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccac
 cccccctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcct
 gctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:13 МТИ-Fc IgG1 3Ser m1 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkepkssdkthtppcpapellggssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvd
 gvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasieltiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltcl
 vkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhlealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:14 МТИ-Fc IgG1 3Ser m1 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagagcccaaatcttcgacaaga
 cccataacctgtccaccttgcctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatct
 cccggaccttgaagtacacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaag
 tgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggattgg
 ctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagcc
 ccgggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtattcta
 cccctccgatatgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggct
 cattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgtccgtgatgcacgaggccctgcac
 aaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:15 МТИ-Fc IgG1 3Ser link3 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtervaacnlpi
 vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqnknkfysekecreycgvpdgdellggsgsggggsepkssdkthtccppcpapel
 lggssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyk
 ckvsnkalspasiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflys
 kltdksrwqqgnvfscsvmhhealhnhytqkslspsg

SEQ ID NO:16 МТИ-Fc IgG1 3Ser link3 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaagaggactcctgccagctgggct
 actctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtagggcgctgcatg
 ggcaacggcaacaactttgtacagagaaaagagtgcctgcagacctgcagaacctggccgcctgtaacctgcctatctgctgggggacc
 ctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaac
 aagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgggaggtggtggatcaggtgg
 cggaggatcagagcccaatcttcgacaagaccatacctgtccacctgcccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgt
 tcccccaaagcccaaggacacctgatgatctccggaccctgaagtgcctgcgtggtggtggatgtgtccacgaggatcccgaag
 tgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtg
 gtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatc
 gaaaagaccatctccaaggccaaggccagccccgggaacccaggtgtacacactgcccctagccgggaagagatgacaaagaac
 caggtgtccctgacctgtctcgtgaagggttctaccttccgatatgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactaca
 agaccacccccctgtgtggactccgacggctcatttctctgtactccaagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggaacgt
 gttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:17 МТИ-Fc IgG1 3Ser link2 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtervaacnlpi
 vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqnknkfysekecreycgvpdgdellrcppcpapellggssvflfppkpkdtlmsr
 tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspasiektiskakg
 qprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltdksrwqqgnvfscsvm
 healhnhytqkslspsg

SEQ ID NO:18 МТИ-Fc IgG1 3Ser link2 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaagaggactcctgccagctgggct
 actctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtagggcgctgcatg
 ggcaacggcaacaactttgtacagagaaaagagtgcctgcagacctgcagaacctggccgcctgtaacctgcctatctgctgggggacc
 ctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaac
 aagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcggtgtccacctgcccctgcc
 cccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacacctgatgatctccggaccctgaagtgcctgcgt
 ggtggtggatgtgtccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagccca
 gagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgc

aaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccccgggaaccccaggtgtacacact
 gccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtattctacctctcgatatgccgtggaatg
 ggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgaca
 gtggacaagtcccggtggcagcagggaacgtgttctctgtcctgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctctg
 tccctgagccccggc

SEQ ID NO:19 МТИ-Fc IgG1 3Ser link1 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtcrtvaacnlpi
 vrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqnknkfysekecreycgvssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfn
 wyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsreemtnq
 vsltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:20 МТИ-Fc IgG1 3Ser link1 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaaggactcctgccagctgggct
 actctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggctgcatg
 ggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatctgcggggacc
 ctgtcgggctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttccctatggcggctgccagggaatggaaac
 aagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgtcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc
 cggaccctgaagtgcctgcgtggtggtgatgtgtccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtg
 cacaacgcccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccactaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggct
 gaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccc
 cgggaaccccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtattctac
 cctccgatatgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctc
 attcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggaacgtgttctctgtcctgatgcacgaggccctgcaca
 accactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:21 МТИ-Fc IgG1 3Ser K21S K22S Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtssedscqlgysagpcmgmtsryfngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtcrtvaacnlpiv
 rgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqnknkfysekecreycgvpdgdellrepkssdkthtppcpapellggssvflfppk
 pkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasi
 ektiskakgpprepqvytlppsreemtnqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqg
 nvfscsvmhhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:22 МТИ-Fc IgG1 3Ser K21S K22S Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtacctcctccaggactcctgccagctgggcta
 ctctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggctgcatgg
 gcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatctgcggggaccct

gtcgggaccttatccagctgtgggacctcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaa
 gtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaatctccgaca
 agaccatacctgtccaccttgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacacctgatg
 atctccgggacctgaagtacgtgcgtggtggtggtggtgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtgg
 aagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggat
 tggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtcaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctcaaggccaaggcca
 gccccgggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggat
 tctacctctcgatatcgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacg
 gctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctg
 cacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:23 МТИ-Fc IgG1 3Ser d2 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkktvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcgnknkfysekecreycgvpdgddeell
 repkssdkthtppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
 vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpe
 nnykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslslspg

SEQ ID NO:24 МТИ-Fc IgG1 3Ser d2 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaaacgtggccgcctgtaacctgc
 ctatcgtgcggggacctgtcgggaccttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaatgcgtgctgttcccctatggcggctgc
 cagggaatggaacaaagtttactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcggg
 agcccaaattctccgacaagaccatacctgtccacctgcccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagc
 ccaaggacacctgatgatctccggacctgaagtacgtgcgtggtggtggtggtgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagtcaattg
 gtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctg
 accgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtcaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatc
 tccaaggccaaggccagccccgggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctga
 cctgtctcgtgaagggaatttacctctcgatatcgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccaccccc
 ctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctcc
 gtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:25 МТИ-Fc IgG1 3Ser d1 Последовательность белка

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsrlyfngtsmacetfpyggcmgnnnfvtekeclqtcrepkssdkth
 tcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhq
 dwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvl
 dsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslslspg

SEQ ID NO:26 МТИ-Fc IgG1 3Ser d1 Последовательность ДНК

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaaggactcctgccagctgggct
 actctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtacggcggtgcatg
 ggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagagagcccaaattctccgacaagaccatacctgtccacct
 tgcctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaaagccaaggacacctgatgatctccggaccttgaagt
 gacctgctggtggtggatgtgtccacgaggatcccgaagtgaagttaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagac
 caagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggattggtgaacggcaagagt
 acaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgggaacccaggt
 gtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggattctaccctccgatatgcc
 gtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgtggactccgacggctcattcttctgtactcca
 agctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccag
 aagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:27 mMTI-mFc mIgG1 Последовательность белка

avlpqesegsgteplitgtlkkedscqlnysepgclgmqueryyngasmacetfyyggclngnfnfisekdclqtertiaacnlpivqg
 pcraklwfadaaqgkciqfhyggckgngkfysekeckeycgvpdgyeelirskivprdcgkpcictvpevssvfifppkpkd
 vltitltpkvctvvddiskddpevqfswfvdddevhtaqtqpreeqfnstfrsvselpimhqdwlngkefkervnsaafpapiektiskt
 kgrpkapqvytipppkeqmakdkvsltcmidffpeditvewqwnqpaaenykntqvimdtdgsyfvysklvqksnweagntf
 tcsvlheglhnhhtekslshspgk

SEQ ID NO:28 mMTI-mFc mIgG1 Последовательность ДНК

gcagtgtgccccaaagagagtgaggggtcagggactgagccactaataactgggacctcaagaaagaagactcctgccagctcaatta
 ctcaagaaggccctgcctagggatgcaagagaggtattactacaacggcgcttccatggcctgcgagaccttcaatatgggggtgccta
 ggcaacggcaacaacttcatctctgagaaggactgtctgcagacatgtcggaccatagcggcctgcaatctccccatagccaaggccct
 gccgagccttcataaagctctgggcatttgatgcagcacaagggaagtgcattccactacgggggctgcaaaggcaacggcaaca
 aatttactctgagaaggatgcaaagagtactgtggagtccctggtgatgggtacgaggaactaatacgagtaaaatcgtgcctcggga
 ctgcggtgcaagccctgcatctgcaccgtgcccagggtgtcctcgtgttcatttcccaccaagccaaggacgtgctgaccatcacc
 ctgacccccaaagtacctgcgtggtggatctccaaggacgaccccgagggtgcagttcagttggttcgtggacgacgtggaagtg
 cacaccgcccagaccagcccagagaggaacagttcaactccacttcagatccgtgtccgagctgccatcatgcaccaggactggctg
 aacggcaaagagttcaagtgcagagtgaactccgccgcttcccagccccatcgaaaagaccatctccaagaccaagggcagacccaa
 ggccccccagggtgtacaccatccccccaccaaagaacagatggccaaggacaagggtgtccctgacctgcatgacaccgatttctcca
 gaggacatcaccgtggaatggcagtggaacggccagcccggcagaactacaagaacaccagcccatcatggacaccgacggctcct
 acttctgtactccaagctgaacgtgcagaagtccaactgggaggccggcaacaccttcacctgtagcgtgctgcacgagggcctgcaca
 accaccacaccgagaagtcctgtccactccccgggaag

SEQ ID NO:29 Fc IgG1 3Ser МТИ Последовательность белка

epkssdkthtccppcapellggssvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv
 vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpen
 nykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahhnyhtqkslspsgkgggsgggsgggsgggsgavlpqeeegsggg
 qlvtevtkkedsqclgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgngnnfvtekeclqtcrtaacnlpivrgpcrafiqlwaf
 davkgkcvlfpypggcqqngnkfysekecreycgvpgdgdeellr

SEQ ID NO:30 Fc IgG1 3Ser МТИ Последовательность ДНК

gagcccaaatcttccgacaagaccatacctgtccaccttgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttcctgttcccccaaa
 gccaaggacacacctgatgatctcccgaccctgaagtacctgctggtggtggtggtggtgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttaat
 tggtagctggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgct
 gaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaagaccat
 ctccaaggccaaggccagccccgggaacccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctg
 acctgtctcgtgaagggtattctaccctccgatatgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccc
 cctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctc
 cgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggcaaggagggtggtggatcaggaggtgga
 ggttccgggtggcggaggatcagctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaaag
 aggactcctgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagac
 attccagtacggcgggtgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaa
 cctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggcaaatgcgtgctgttccctatggcg
 gctgccagggaatggaaacaagtttactccgagaaagaatccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctg
 cgg

SEQ ID NO:31 чМТИ последовательность белка

avlpq eeegsgggql vtevtkkeds cqlgysagpc
 mgmtsryfyn gtsmacetfq yggcmgngnn fvtekeclqt crtvaacnlp ivrgpcrafi
 qlwafdavkg kcvlfpypggc qngnkfyse kecreycgvp gdgdeellrf sn

SEQ ID NO:32 AMBP последовательность препробелка

mrslgallll lsac lavsag pvptppdniq vqenfnisri ygwynlaig stcpwlkkim
 drmtvstl vl gegateaeis mtstrwrkgv ceetsgayek tdt dgkflyh kskwnitmes
 yvvhtnydey aifltkkf sr hhgptitakl ygrapqlret llq dfrvvaq gvgipedsif
 tmdrgecvp geqepipili prvravlpq eeegsgggql vtevtkkeds cqlgysagpc
 mgmtsryfyn gtsmacetfq yggcmgngnn fvtekeclqt crtvaacnlp ivrgpcrafi
 qlwafdavkg kcvlfpypggc qngnkfyse kecreycgvp gdgdeellrf sn

SEQ ID NO:33

SGGGGS

SEQ ID NO:34

SGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 35

SGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:36

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:37

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:38

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:39

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:40

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:41 SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:42

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:43

GSGGGSGGGGSGGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный белок МТИ, содержащий свободный UTI, содержащий 143 аминокислот, и линкер, связанный с Fc-доменом дикого типа, где Fc-домен не содержит первую константную область домена иммуноглобулина, или его фрагмент, который не содержит один или несколько замен.

2. Димер, содержащий два выделенных химерных белка по п.1, где Fc-домены ковалентно связаны.

3. Фармацевтическая композиция для лечения состояния, связанного с МТИ, содержащая химерный белок по п.1, или димер по п.2, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

4. Применение химерного белка по п.1, или димера по п.2, в качестве лекарственного средства для лечения состояния, связанного с МТИ.

5. Способ лечения состояния, связанного с МТИ, включающий введение пациенту эффективного количества химерного белка по п.1, или димера по п.2.

6. Способ по п.5, в котором состояние, связанное с МТИ, выбрано из индуцированного эндоскопией панкреатита, острого панкреатита, артрита, атипичной пневмонии, синдрома системного воспалительного ответа, острой недостаточности кровообращения, сепсиса, гепатита, аппендицита, колита, органной недостаточности, поражения поджелудочной железы, почек, легких, реперфузионного повреждения, синдрома Стивенса-Джонсона, токсического эпидермального некролиза, шока, ишемических повреждений, острого повреждения легких, повреждения легких, вызванного острым расслоением аорты, астмы, пневмонии, пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией легких, диссеминированного внутрисосудистого свертывания и острого респираторного дистресс-синдрома.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный белок по п.1.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая димер по п.2.

9. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.7 или п.8.

10. Рекомбинантная клетка-хозяин для продукции химерного белка по п.1, содержащая вектор экспрессии по п.9.

11. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.10, выбранная из клетки млекопитающего, клетки насекомого, E.coli, дрожжевой клетки и клетки растения.

12. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.11, представляющая собой клетку млекопитающего, выбранную из клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HEK 293, клетки NSO, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS) и клетки гепатоцеллюлярного рака человека.

13. Способ получения химерного белка по п.1, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по любому из пп.10-12 в среде для роста и выделение химерного белка из клетки или среды для роста.

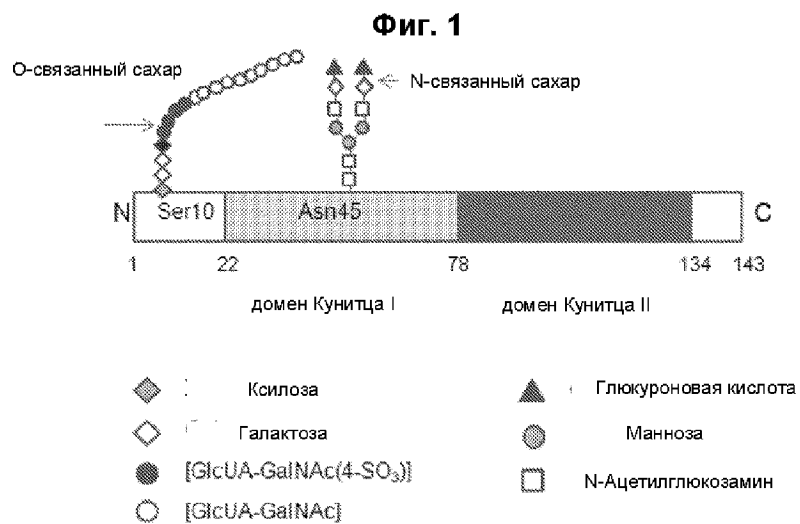
14. Применение слитого белка по п.1 в качестве лекарственного средства для лечения состояния, связанного с МТИ, выбранного из индуцированного эндоскопией панкреатита и острого панкреатита; артрита, атипичной пневмонии, синдрома системного воспалительного ответа, острой недостаточности кровообращения, сепсиса, гепатита, аппендицита, колита, органной недостаточности, поражения органов, в том числе поражение поджелудочной железы, почек, легких; реперфузионного повреждения, синдрома Стивенса-Джонсона, токсического эпидермального некролиза, шока, ишемических повреждений, острого повреждения легких, в том числе, вызванного острым расслоением аорты; астмы, пневмонии, в том числе пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией легких, диссеминированного внутрисосудистого свертывания и острого респираторного дистресс-синдрома.

15. Применение димера по п.2 в качестве лекарственного средства для лечения состояния, связанного с МТИ, выбранного из индуцированного эндоскопией панкреатита и острого панкреатита; артрита, атипичной пневмонии, синдрома системного воспалительного ответа, острой недостаточности кровообращения, сепсиса, гепатита, аппендицита, колита, органной недостаточности, поражения органов, в том числе поражения поджелудочной железы, почек, легких; реперфузионного повреждения, синдрома Стивенса-Джонсона, токсического эпидермального некролиза, шока, ишемических повреждений, острого повреждения легких, в том числе, вызванного

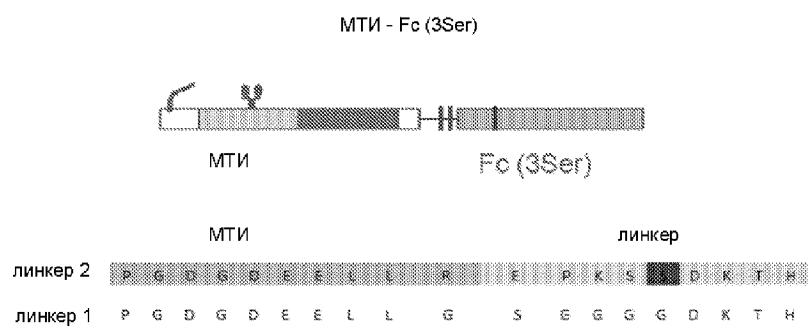
острым расслоением аорты; астмы, пневмонии, в том числе пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией легких, диссеминированного внутрисосудистого свертывания и острого респираторного дистресс-синдрома.

16. Применение по п.14 или 15, где состояние, связанное с МТИ, выбрано из панкреатита, индуцированного эндоскопией панкреатита и острого панкреатита.

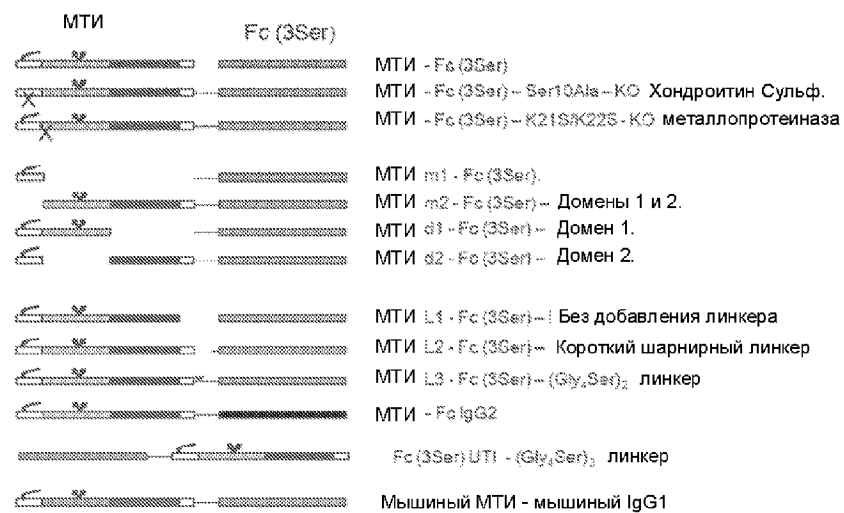
По доверенности



Фиг. 2

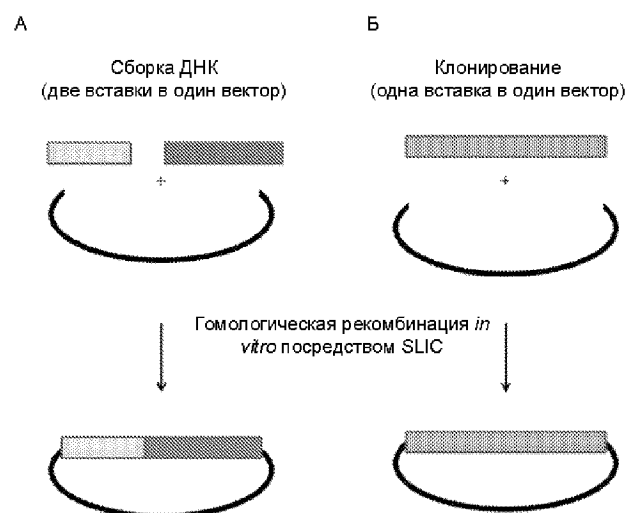


Фиг. 3



Фиг. 4

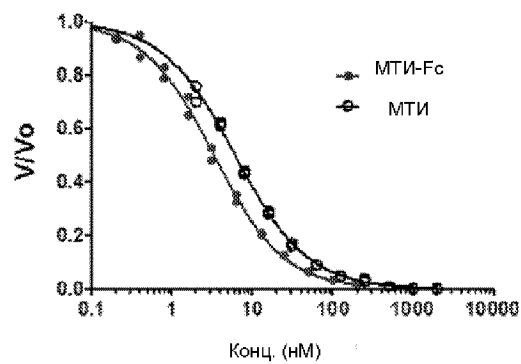
Сборка и клонирование ДНК посредством SLIC



Li MZ and Elledge SJ (2007), Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods* 4(3):251-256.

Фиг. 5

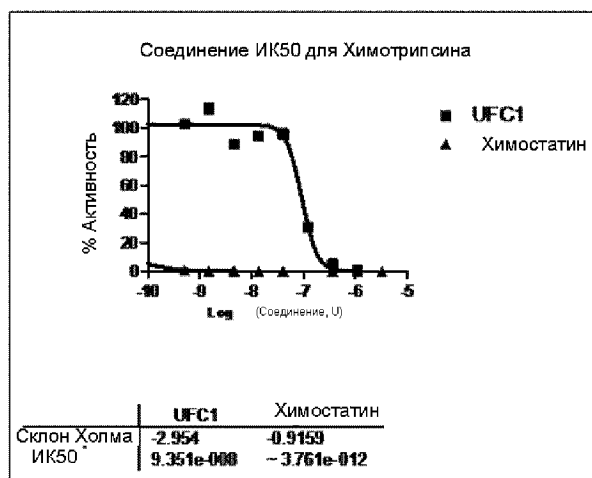
Ингибирование Трипсина МТИ-Fc против МТИ



$$Y = \text{Вершина} / (1 + ((X/IC50)^{\text{Холм}}))$$

	МТИ-Fc	МТИ
Вершина	= 1.000	= 1.000
ИК50	3.327	6.088
Холм	1.009	0.9666

Фиг. 6

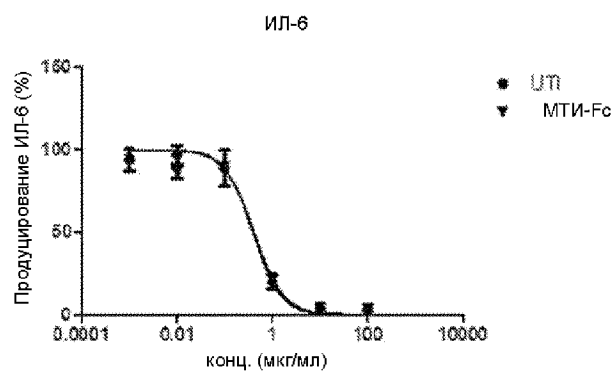


Фиг. 7

Соединение ИК50 (М)

Target	МТИ-Fc (UFC1)	Контроль I ИК50 (М)	Контрольное соединение
Каспаза 1	1.33E-06	7.30E-08	ИЕТD-СНО
Катепсин С	5.48E-06	2.29E-07	Е 64
Катепсин G	> 1.0E-05	5.83E-07	Химостатин
Химотрипсин	9.35E-08	< 5.08E-10	Химостатин
Папаин	3.29E-06	< 5.08E-10	Е64
Плазмин	6.63E-08	6.14E-08	Габексата Мезилат
Протеиназа К		9.71E-08	Ингибитор Протеиназы К
TACE/ADAM17	> 1.0E-05	1.69E-08	СМ0001
Тромбин		2.60E-06	Габексата Мезилат
Триптаза бета II		1.81E-09	Габексата Мезилат

Фиг. 8

Значения IC_{50} (мкг/мл)

	МТИ	МТИ-Fc
Продукция ИЛ-6	0.40	0.41

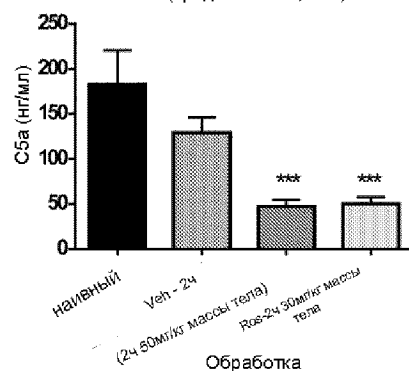
МТИ-Fc

Фиг. 9

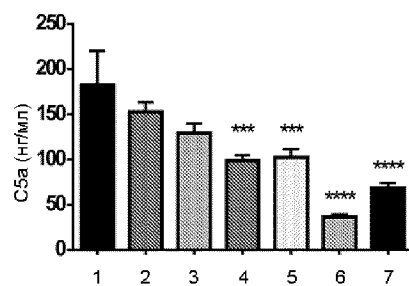
Наименование Белка Protein Name	№ п/п	Титр (мг/мл)	Концентрация (мг/мл)	Объем (мл)	Выработка (мгс)	Рабочий объем (млс)	% Восстановлен ии
МТИFc{3Ser}	711	45	2.8	2	5.50	200	60.7
МТИFc{3Ser}-Ser18Ala	712	52	3.4	2	6.75	200	65.5
МТИFc{3Ser}-K21S/K22S	713	40	2.3	2	4.67	200	58.1
МТИm1-Fc{3Ser}	714	51	2.9	2	5.71	200	56.5
МТИm2-Fc{3Ser}	715	2					
МТИd1-Fc{3Ser}	716	41	2.5	2	4.94	200	60.7
МТИd2-Fc{3Ser}	717	52	2.7	2	5.42	200	52.3
МТИL1-Fc{3Ser}	718	33	2.1	2	4.18	200	62.7
МТИL2-Fc{3Ser}	719	40	2.4	2	4.80	200	60.3
МТИL3-Fc{3Ser}{Gly4Ser}2							
линкер	720	38	2.5	2	4.93	200	64.7
МТИFc{IgG2}	721	39	2.5	2	5.06	200	64.3
Fc{3Ser}-МТИ{Gly4Ser}3							
линкер	722	31	1.9	2	3.85	200	62.8
мышиний МТИ - мышиний IgG1	723	4					

Фиг. 10

Влияние SEQ ID NO:1 на индуцированный ЛПС C5a у мышей СЗН
(среднее + сос, n=8)



Влияние SEQ ID NO:1 на индуцированный ЛПС C5a
у мышей СЗН(среднее + сос, n=8)



SEQ ID NO:1
Обработка

- 1- наивный
- 2- Veh- 4ч
- 3- 4ч- 5мг/кг массы тела
- 4- 4ч- 20мг/кг массы тела
- 5- 4ч- 50мг/кг массы тела
- 6- 4ч- 100мг/кг массы тела
- 7- Ros-4ч- 30мг/кг массы тела

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202091567

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 14/81 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 47/68 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/08 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/81, 16/00, 19/00, C12P 21/02, A61K 38/55, 47/68, A61P 1/00, 1/04, 1/16, 1/18, 11/00, 11/06, 13/12, 17/00, 19/02, 29/00, 31/00, 31/04, 31/14, 37/06, 43/00, 7/00, 7/08, 9/00, 9/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X Y	JP 2013-253079 A (XUHUA (SHANGHAI) BIOLOGICAL RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO LTD) 19.12.2013, параграфы [0002], [0009], [0014], [0016], [0021]-[0030], [0033]-[0041], фигуры 2-5, SEQ ID NO: 1-6	1, 4-16 2, 3
D, Y	CN 103044554 A (XUHUA (SHANGHAI) BIOLOGICAL DEVELOPMENT CENTER CO., LTD.) 17.04.2013, параграфы [0012]-[0030], [0052]-[0070], [0081]-[0093], [0098]-[0100], фигуры 1-4	2, 3
Y	RU 2262510 C9 (ЛЕКСИГЕН ФАРМАСЬЮТИКЭЛС КОРП.) 20.10.2005, страницы 6-7, 10, 13	2

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

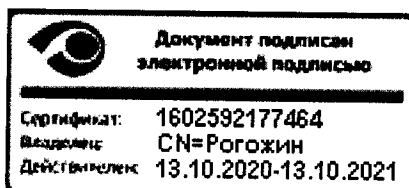
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **01/06/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин