

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092963** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.03.19

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.12

---

(54) **НОВЫЙ БЕЛОК С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

---

(31) 1809703.0; 16/007,742

(32) 2018.06.13

(33) GB; US

(86) PCT/GB2019/051622

(87) WO 2019/239126 2019.12.19

(71) Заявитель:

**ИМЬЮН РЕГЬЮЛЕЙШН  
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Корригелл Валери Мэри, Панайи  
Габриэль Ставрос (GB)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Данное изобретение обеспечивает выделенный или рекомбинантный белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID: NO: 4, и его применение для профилактики или лечения воспалительного состояния.

**A1**

**202092963**

**202092963**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-566478EA/025

## **НОВЫЙ БЕЛОК С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к новому белку, его применению в медицине, в частности к его применению для профилактики или лечения воспалительных состояний, а также к способам получения белка.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Сообщалось о противовоспалительных свойствах молекулярного шаперона человека, известного как связывающий белок иммуноглобулина (BiP) или регулируемый глюкозой белок 78 (Grp78) (Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS. The stress protein, BiP, stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express an anti-inflammatory cytokine profile and to inhibit antigen presenting cell function: relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1167-1171). Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка человека, экспрессируемого бактериями, отличается от известной последовательности природного белка (SEG ID NO: 5).

BiP представляет собой повсеместно эндогенно экспрессируемый белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и необходимый в качестве внутриклеточного белка как для правильного сворачивания растущих полипептидов, так и для защиты клетки от накопленных неправильно свернутых белков во время стресса ER.

Следовательно, BiP также определяется как стрессовый белок и член семейства 70 белков теплового шока. Повышенная регуляция во время клеточного стресса BiP экспрессируется на клеточной поверхности и секретируется во внеклеточный матрикс, так что бесклеточный BiP может секретироваться в синовиальную жидкость пациентов с ревматоидным артритом (Corrigall VM et al supra.).

Ген, кодирующий этот природный (встречающийся в природе) BiP, p78, был клонирован, и рекомбинантный белок человека был экспрессирован (W02000/21995).

WO 2000/21995 раскрывает новые белковые аналоги BiP (SEQ.1 и SEQ.2) и их применение при лечении воспалительного заболевания.

WO2006/111720 раскрывает применение тех же двух аналогов для лечения и предотвращения потери и резорбции костной ткани.

В W02002/072133 раскрыто применение BiP, в частности SEQ.1 и SEQ.2 из W02000/21995, для лечения или предотвращения нежелательного иммунного ответа, включая лечение иммуноопосредованного заболевания, такого как аутоиммунное заболевание, диабет I типа, тиреоидит, рассеянный склероз, волчанка, болезнь Крона, гепатит или нежелательный иммунный ответ, связанный с отторжением трансплантата органа.

Хотя аналоги BiP (SEQ.1 и SEQ.2) демонстрируют результаты в ряде моделей воспаления на животных *in vitro* и *in vivo*, экстраполяция этих моделей для прогнозирования того, что может произойти в клинике, является проблематичной, и

остается проблема производства белка подходящей чистоты и эффективности для введения пациентам.

Аналоги BiP SEQ.1 и SEQ.2 (здесь и далее SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2) получают с применением бактериальных клеток, но они не подходят в качестве клинических продуктов для введения человеку по нескольким причинам. Сообщалось, что бх гистициновая метка в SEQ ID NO: 1 (применяемая для выделения белка с помощью аффинной хроматографии) может изменять физические и функциональные свойства белка. (Santiago FW et al, Antigenic and immunogenic properties of recombinant hemagglutinin proteins from H1N1 when produced in various protein expression systems, Vaccine, Volume 30, Issue 31, 29 June 2012, Pages 4606-4616,), в то время как ионы металлов, используемые для хелатирования могут попасть в кровоток, если не удалить их полностью. SEQ ID NO: 1 поэтому не подходит для клинического применения.

Хотя применение бактериальных клеток в качестве способа получения проще и дешевле, чем применение трансформированных клеток млекопитающих, существует проблема, заключающаяся в том, что в результате получают белки, которые не являются гликозилированными и могут не иметь такого же свертывания, как их эквивалент у млекопитающих. Кроме того, содержание эндотоксинов в бактериальном продукте остается высоким и может вызывать побочные эффекты при введении людям. В основном техническая сложность удаления эндотоксина из продукта привела к росту популярности продукции трансформированных белков клеток млекопитающих, несмотря на его стоимость. Очистка от эндотоксина в процессе производства технически сложна, дорога и требует много времени. Кроме того, масштабируемость процессов производства и очистки может вызывать сложности.

Соответственно, существует потребность в получении нового белка с противовоспалительными и/или иммунорегуляторными свойствами на основе BiP, который подходит для введения человеку, но при этом может быть легко получен с применением масштабируемого процесса, а также эффективен в терапии.

### **РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Эти потребности удовлетворяются с помощью нового белка в соответствии с изобретением.

Соответственно, согласно одному аспекту изобретения предложен выделенный или рекомбинантный белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID: NO: 4.

Данное изобретение относится к аналогу связывающего белка иммуноглобулина (BiP), SEQ ID NO: 3, показанного на Фигуре 4. Предсказанная аминокислотная последовательность нативного BiP представлена на Фигуре 1 и может быть найдена под регистрационным номером X87949 в общедоступной базе данных NCBI Genbank. Нуклеотидная последовательность нативного BiP показана на Фигуре 2. Нативная аминокислотная последовательность имеет сигнальную последовательность MKLSLVAAML LLLSAARA, прикрепленную к n-концу. Расщепление сигнальной

последовательности после остатка аланина высвобождает зрелый полипептид, начинающийся с «EEED ...»

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 3 отличается от последовательности природного ViP тем, что N-конец начинается с последовательности «RAEEED ...», а не с «EEED ...».

Это включает две с-концевые аминокислоты нативной сигнальной последовательности (аргинин и аланин). У специалиста в данной области техники не будет причин включать RA на n-конце - в нативной форме активный полипептид начинается с остатка глутаминовой кислоты, и будет понятно, что, если бы специалист в данной области техники стремился предоставить модифицированную форму ViP, есть несколько вариантов, включая расщепление сигнальной последовательности в разных положениях и обеспечение любого количества мутаций, добавлений или делеций.

SEQ ID NO: 4 соответствует SEQ ID NO: 3 с полигистидиновой аффинной меткой (здесь и далее His-tag) на n-конце белка (см. Фиг. 3). His-tag облегчает очистку белка с помощью аффинной хроматографии с ионами металлов.

SEQ ID NO: 3 также имеет значительные отличия от SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, раскрытых в WO2000/21995. Как обсуждалось выше, SEQ ID NO: 1 имеет His-метку на с-конце, а n-конец начинается с «MEED ...». SEQ ID NO: 2 соответствует SEQ ID NO: 1, но без His-метки.

Неожиданно было обнаружено, что белок SEQ ID NO: 3 обладает сильными противовоспалительными и иммунорегуляторными свойствами, которые отличаются от свойств, описанных в WO2000/21995 и WO2006/111720. Специалист в данной области техники не ожидал этих значительных различий. Эти свойства демонстрируются в данной заявке соответствующими исследованиями *in vitro* и *in vivo*. Дополнительно, белок, в соответствии с данным изобретением, безопасен для применения людьми.

Ключевые функциональные различия между SEQ ID NO: 3 в соответствии с данным изобретением и SEQ ID NO: 1 в WO2000/21995, и WO2006/111720 заключаются в следующем:

1) Производство цитокина TNF $\alpha$  мононуклеарными клетками периферической крови значительно снижается в присутствии SEQ ID NO: 3 по сравнению с SEQ ID NO: 1 (см. Пример 2);

2) SEQ ID NO: 1 вызывает подавление экспрессии CD86 и HLA-DR, тогда как SEQ ID NO: 3 не выявляет значительной потери экспрессии HLA-DR и CD86 (см. Пример 3);

3) SEQ ID NO: 3 подходит для применения у людей, и в клинических испытаниях не было отмечено реакций на инфузию или серьезных побочных реакций на лекарства (см. Пример 4). В отличие от этого, SEQ ID NO: 1 не подходит для введения людям.

4) SEQ ID NO: 3 вызывает значительное снижение сывороточных концентраций CRP, VEGF и IL-8 у людей по сравнению с группами плацебо. Это указывает на то, что болезненное воспаление было значительно уменьшено введением SEQ ID NO: 3 (см. Пример 4)

5) SEQ ID NO: 3 вызывает повышение экспрессии CD39 на регуляторных Т-клетках по сравнению с SEQ ID NO: 1; в клинике наблюдалось значительное увеличение экспрессии CD39 на регуляторных Т-клетках у пациентов, отвечающих на SEQ ID NO: 3, и это сохранялось в течение 12 недель после инфузии (см. Пример 5);

6) SEQ ID NO: 3 ингибирует дифференцировку остеокластов и резорбтивную активность (см. Пример 6);

7) Есть доказательства того, что SEQ ID NO: 3 не имеет общего иммуносупрессивного эффекта, в отличие от SEQ ID NO: 1, который снижает ответ антигена отзвва на туберкулин PPD (см. пример 7);

8) Введение SEQ ID NO: 3 приводит к более длительному выживанию кожных трансплантатов в животной модели (см. Пример 8).

Данное изобретение включает выделенные или рекомбинантные белки, имеющие одно или более консервативных замещений в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. «Консервативное замещение» - это замещение, при котором аминокислотный остаток замещается другим биологически подобным аминокислотным остатком, например, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, 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). Например, замещение тирозина на фенилаланин является консервативным замещением. Способы идентификации консервативных аминокислотных замещений, которые не влияют негативно на функцию белка, хорошо известны в данной области техники.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения выделенный или рекомбинантный белок ViP, в соответствии с данным изобретением, содержит примеси эндотоксина в количестве менее 50 единиц эндотоксина (EU) на мг белка. В предпочтительном варианте воплощения изобретения выделенный или рекомбинантный белок содержит примеси эндотоксина в количестве менее 25 единиц эндотоксина (EU) на мг белка. В предпочтительном варианте воплощения изобретения выделенный или рекомбинантный белок содержит примеси эндотоксина в количестве менее 2 единиц эндотоксина на мг белка, наиболее предпочтительно менее 1,5 единиц эндотоксина на мг белка.

Эндотоксин выявляют с помощью теста Limulus Amebocyte Lysate (LAL) для обнаружения и количественного определения бактериальных эндотоксинов, экстрагированных из внешней мембраны грамотрицательных бактерий (Associates of Cape Cod, Liverpool, UK). Важнейший компонент LAL-реагентов, используемых в тестах на

эндотоксины, получают из клеток крови (амебоцитов) мечехвоста, *Limulus Polyphemus*. LAL-тесты описаны в главе «Тест на бактериальные эндотоксины» в *United States Pharmacopeia* (Chapter <85>) и в эквивалентных главах в *European Pharmacopoeia* (Chapter 2.6.14) и в *Japanese Pharmacopoeia* (General Tests, No. 4.01).

Белок, в соответствии с данным изобретением, не гликозилирован или по существу не гликозилирован, в отличие от нативного белка, который гликозилирован.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенную или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID: NO. 4.

Предпочтительно выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 3 состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID: NO 8.

В дополнительном аспекте предлагается рекомбинантный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, как определено выше.

Вектор может содержать промоторную и/или операторную последовательность.

Вектор может содержать последовательности, не относящиеся к млекопитающим, например последовательности из бактерий или дрожжей. Вектор может содержать промоторную и/или операторную последовательность, не относящуюся к млекопитающим, такую как бактериальную или дрожжевую промоторную и/или операторную последовательность.

В дополнительном аспекте изобретение относится к выделенному или рекомбинантному белку, как определено выше, для применения в медицине или ветеринарии. Белок, в соответствии с данным изобретением, может применяться у человека или животных, не являющихся человеком.

В еще одном дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному или рекомбинантному белку, как определено выше, для применения при лечении и/или профилактике воспалительного состояния. Предпочтительно лечение и/или профилактика воспалительного состояния достигается без значительной иммуносупрессии. В одном варианте воплощения изобретения лечение и/или профилактика воспалительного состояния достигается без значительной иммуносупрессии, что измеряется по активности Т-лимфоцитов по сравнению с активностью до введения белка. В одном варианте воплощения изобретения отсутствует значительное ингибирование пролиферации Т-клеток по отношению к антигену-приманке, такому как очищенное от туберкулина производное белка или митоген, такой как фитогемагглютинин (РНА), или подложки, покрытые анти-CD3 или анти-CD28 антителами.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения, воспалительное состояние выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилита, отторжения трансплантата органа, кожи, ткани, крови, сыворотки, плазмы или клеток, или воспалительного заболевания кишечника, такого как болезнь Крона.

В особенно предпочтительном варианте воплощения изобретения воспалительное состояние выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита или ювенильного идиопатического артрита.

В одном варианте воплощения изобретения выделенный или рекомбинантный белок предназначен для применения при лечении или профилактике заболеваний, связанных с нарушением метаболизма костной ткани, например остеопороза, потери костной массы, резорбции костной ткани, болезни Педжета, рака молочной железы, рака костей или потери костной массы, связанной с раком. Известно, что метастатический рак молочной железы связан с потерей костной массы (<http://www.nationalbreastcancer.org/metastatic-breast-cancer>).

В другом аспекте выделенный или рекомбинантный белок, как определено выше, предназначен для применения для предотвращения расшатывания эндопротезного сустава.

В одном варианте воплощения изобретения выделенного или рекомбинантного белка, как определено выше для применения, определенного выше, применение включает введение белка в дозе от 1 мг до 1 г, необязательно от 1 мг до 500 мг, необязательно от 1 мг до 50 мг, необязательно от 1 до 15 мг.

Дозировка может составлять 1 мг, 5 мг или 15 мг.

Белок можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз.

Дозу можно вводить в виде однократной внутривенной инфузии в течение периода времени от 0,5 до 3 часов, необязательно от 1 до 2 часов, предпочтительно 1 часа.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения пациенту вводят дозу 1 мг или 5 мг, или 15 мг в течение периода времени 1 час.

В альтернативном воплощения изобретения пациенту можно вводить несколько доз, при этом интервал между введением каждой дозы составляет по меньшей мере 1 час, или по меньшей мере 2 часа, или по меньшей мере один день, или по меньшей мере 1 неделю.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон, и любое отдельное значение, представленное в данной заявке, может служить конечной точкой для диапазона, который включает другие отдельные значения, указанные в данной заявке.

Например, набор значений, таких как 1, 2, 3, 8, 9 и 10, также является раскрытием диапазона чисел от 1 до 10, от 1 до 8, от 3 до 9 и так далее.

Аналогичным образом, раскрытый диапазон представляет собой раскрытие каждого отдельного значения, охватываемого диапазоном.

Например, заявленный диапазон 5-10 также является раскрытием 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

В дополнительном аспекте данное изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую выделенный или рекомбинантный белок, как определено в любом из предшествующих пунктов, и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей, адъювантов или носителей. Один или более фармацевтически приемлемые наполнители, адъюванты или носители конкретно не ограничиваются, и подходящие вспомогательные вещества, адъюванты или носители должны быть известны специалисту в данной области техники.

Можно применять любой подходящий способ введения. Например, может подходить любой из пероральных, местных, парентеральных, окулярных, ректальных, вагинальных, ингаляционных, буккальных, сублингвальных и интраназальных маршрутов доставки.

Фармацевтические композиции для парентерального введения могут быть предпочтительны. Белки и фармацевтические композиции, в соответствии с данным изобретением, можно вводить парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, внутривентрикулярно, интратекально, внутривентрикулярно, интракраниально, внутримышечно или подкожно, или их можно вводить с помощью инфузий. Особенно предпочтительно внутривенное введение.

Фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как физиологический солевой раствор. Подходящие фармацевтические композиции могут содержать один или более из: буфера (например, ацетат, фосфат, цитрат), поверхностно-активного вещества (например, полисорбат), стабилизирующего агента (например, человеческий альбумин, полиол, аминокислота), консерванта (например, бензоат натрия) и/или других обычных солюбилизующих, или диспергирующих агентов.

Фармацевтические композиции, в соответствии с данным изобретением, могут быть в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или глюкозы, чтобы сделать раствор изотоническим с кровью. При необходимости водные растворы должны быть забуферены (предпочтительно до pH от 3 до 9). Приготовление подходящих парентеральных композиций в стерильных условиях легко осуществляется стандартными фармацевтическими методами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Лекарственные средства и фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Лекарственные средства и композиции могут быть представлены в контейнерах для однократных или многократных доз, например, в запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированных условиях, требующих только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные растворы и суспензии для специально подготовленной инъекции могут быть приготовлены из стерильных порошков, подложек и таблеток, описанных выше.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит забуференный фосфатом физиологический раствор при pH 7,2-7,6, наиболее предпочтительно pH 7,4. В одном варианте воплощения изобретения

фармацевтическая композиция содержит 0,9% мас./об. физиологического раствора.

В одном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит выделенный или рекомбинантный белок в количестве от 2,0 до 50,0 мг/мл, необязательно от 2,0 до 10,0 мг/мл, предпочтительно в количестве приблизительно 5,0 мг/мл.

Обычно фармацевтическая композиция подходит для внутривенного введения.

В дополнительном аспекте данное изобретение обеспечивает способ лечения и/или предотвращения состояния, как определено выше, у пациента, включающий стадию введения пациенту, который в этом нуждается, эффективного количества изолированного или рекомбинантного белка, как определено выше, или фармацевтической композиции, как определено выше.

Такие термины, как «лечить», или «лечение» относятся к терапевтическим мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование нежелательного физиологического состояния, диагностированного патологического состояния, заболевания или расстройства.

Таким образом, те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние, болезнь или расстройство. В некоторых вариантах воплощения субъекта успешно «лечат» от состояния, заболевания или расстройства, если у пациента наблюдается, например, полное, частичное или временное облегчение или устранение симптомов, связанных с состоянием, заболеванием или расстройством; уменьшение степени состояния, заболевания или расстройства; стабилизация (то есть не ухудшение) состояния, заболевания или расстройства; задержка начала или замедления прогрессирования состояния, заболевания или расстройства; улучшение состояния, заболевания или расстройства, включая частичную или полную ремиссию; и/или продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без получения лечения.

«Предотвратить» или «предотвращение», или «профилактика» относятся к профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния, заболевания или расстройства. Таким образом, люди, нуждающиеся в профилактике, включают тех, кто предрасположен к состоянию, заболеванию или расстройству, или подвержен им. В некоторых вариантах воплощения изобретения состояние, заболевание или расстройство успешно предотвращается, если у пациента развивается временно или постоянно, например, меньшее количество или менее серьезные симптомы, связанные с состоянием, заболеванием или расстройством, или более позднее появление симптомов, связанных с состоянием, заболеванием или расстройством, чем у пациента, который не подвергался воздействию способов в соответствии с данным изобретением.

В одном из вариантов воплощения изобретения пациенту дополнительно вводят один или более терапевтических агентов или когда белок представлен в комбинации с одним или более терапевтическими агентами. В предпочтительном варианте воплощения изобретения терапевтический агент выбран из агентов, модифицирующих заболевание,

анальгетиков, противовоспалительных агентов, иммунотерапевтических агентов, антибиотиков, антител и стероидов. В конкретном варианте воплощения изобретения терапевтическое средство представляет собой противоревматическое лекарственное средство, модифицирующее заболевание (DMARD).

В дополнительном аспекте данное изобретение обеспечивает способ получения рекомбинантного белка, состоящего из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3, где способ включает:

а) трансформацию микроорганизма рекомбинантным вектором, как определено в п.б;

б) культивирование микроорганизма, приводящее к производству белка в соответствии с SEQ ID NO: 4;

в) лизирование микроорганизмов для высвобождения белка;

г) обработку лизата детергентом для удаления эндотоксина;

д) выделение и очистку белка с использованием афинной хроматографии с иммобилизованным металлом, где иммобилизованный металл представляет собой кобальт; и

е) контактирование очищенного белка с ферментом диаминопептидазой, где диаминопептидаза отщепляет гистидиновую метку от N-конца белка; и

ж) разделение расщепленного белка и гистидиновой метки.

Предпочтительно микроорганизм представляет собой бактерию, наиболее предпочтительно *Eschericia coli*.

В одном предпочтительном варианте воплощения изобретения микроорганизм культивируют в среде, свободной от продуктов животного происхождения или практически свободной от продуктов животного происхождения.

Обычно способ включает один или более дополнительных этапов обработки белка детергентом для удаления эндотоксина. Детергентом может быть 1,1,3,3-(тетраметилбутил) фенилполиэтиленгликоль. В качестве альтернативы белок можно обработать аргинином для удаления эндотоксина.

Вышеуказанный способ предпочтительно предназначен для получения белка, имеющего менее 25 единиц эндотоксина на мг белка, необязательно менее 2 единиц эндотоксина на мг белка. Добавление детергента или аргинина позволяет удалить эндотоксин.

Стадия е) происходит при температуре, подходящей для активности фермента диаминопептидазы, предпочтительно приблизительно 37 ° C.

Обычно стадию ж) проводят с использованием афинной хроматографии с иммобилизованным металлом, где иммобилизованный металл представляет собой кобальт. Расщепленная His-метка связывается с колонкой, и очищенный белок элюируется из колонки.

Предпочтительно способ не включает более одной стадии замораживания-оттаивания.

Предпочтительно белок не замораживают ни на одном этапе данного способа. Если необходимо хранить белок между этапами способа, белок хранят при температуре от 2 до 8 °С.

В одном варианте воплощения изобретения способ дополнительно включает одну или более стадий фильтрации, очистки или концентрирования.

В одном варианте воплощения изобретения клетки лизируют фрагментацией, в частности, с использованием пресса Френча.

В другом варианте воплощения изобретения белок, в соответствии с данным изобретением, получают с применением клеток-хозяев, отличных от бактериальных. В одном варианте воплощения изобретения белок, в соответствии с данным изобретением, получают с применением клеток, полученных из дрожжей, насекомых или грибов.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения белок, в соответствии с данным изобретением, получают с применением клеток млекопитающих.

Ниже будут описаны неограничивающие примеры со ссылкой на следующие фигуры:

На Фигуре 1 показана аминокислотная последовательность нативного ViP. Первичная структура ViP состоит из 664 аминокислот. На N'-конце лидерная последовательность из 18 аминокислот (подчеркнута) расщепляется во время посттрансляционных изменений.

На Фигуре 2 показана нуклеотидная последовательность нативного ViP. Ген ViP составляет 2,5 килобаз.

На Фигуре 3 показана SEQ ID: NO 4, белок, в соответствии с данным изобретением, включающий His-метку на N-конце до расщепления во время очистки.

На Фигуре 4 показана SEQ ID: NO 3, белок, в соответствии с данным изобретением (не включая His-метку).

На Фигуре 5A показан рекомбинантный вектор pQE-2, используемый для клонирования природного гена ViP. На схеме используемого вектора показан сайт для гистидиновой метки и сайты расщепления для ферментов рестрикции.

На Фигуре 5B показана последовательность ViP (SEG ID NO: 8), клонированная в сайт NdeI/NotI вектора pQE-2.

На Фигуре 6 показано выравнивание аминокислотной последовательности белка SEQ ID NO: 4 в соответствии с данным изобретением с аминокислотной последовательностью нативного белка.

На Фигуре 7 представлена SEQ ID NO: 1, SEQ 1 из WO00/21995.

На Фигуре 8 показаны SEQ ID NO: 2, SEQ 2 из WO00/21995.

На Фигуре 9 представлена SEQ ID NO: 7.

На Фигуре 10 показано сравнение продукции цитокинов, индуцированной SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3. Мононуклеарные клетки периферической крови культивировали в течение 24 часов в присутствии либо SEQ ID NO: 1 (A, B), либо SEQ ID NO: 3 (C, D, E и F) в показанных концентрациях. Применяли PBMC от 4 здоровых контролей

(заштрихованные обозначения) и одного пациента с ревматоидным артритом (незаштрихованные обозначения). Через 24 часа собирали супернатанты и производили фактор некроза опухоли (TNF)  $\alpha$  и интерлейкин (IL)10 количественно определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). E и F показывают те же данные, что и C и D, но с индивидуальной шкалой оси y, позволяющей идентифицировать пять наблюдаемых образцов.

На Фигуре 11 показаны данные экспериментов с применением мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), культивированных отдельно или с SEQ ID NQ: 3 или SEQ ID NO: 1 в течение 24 часов перед проточным цитометрическим анализом с применением антител, меченых флуоресцеином, анти-CD80 фикоэритрина, анти-CD86. флуоресцеин изотиоцианата (FITC) или HLA-DR.FITC.

Во всех случаях образцы PBMC были закрыты для доступа только к популяции CD14.

PBMC культивировали либо А) без обработки; В и Е) в присутствии SEQ ID NQ: 3 или С) и D) в присутствии SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 демонстрирует подавление регуляции CD86, а также HLA-DR. Напротив, SEQ ID NO: 3 в соответствии с изобретением не показала значительной потери экспрессии HLA-DR и CD86.

На Фигуре 12 показано влияние SEQ ID NO: 3 на уровни С-реактивного белка (CRP) в сыворотке, взятые у пациентов в первом клиническом испытании на людях для SEQ ID NO: 3. Показаны три группы пациентов: плацебо, активные респонденты (R) и все пациенты, получившие SEQ ID NO: 3. Изменение уровней CRP в сыворотке от уровня до инфузии через 2 недели и 12 недель после инфузии измеряли для группы плацебо, ответившей группы и всех пациентов, получавших SEQ ID NO: 3. Через 12 недель значительное падение уровня CRP было отмечено у пациентов, получавших SEQ ID NO: 3.

\* этот пациент пропустил прием сопутствующего метотрексатного лекарственного средства, что является нарушением протокола.

На Фигуре 13 показаны изменения уровней биомаркеров у пациентов, получавших SEQ ID NO: 3.

Концентрации VEGF и IL-8 в сыворотке измеряли с помощью технологии шариков Lumindex, и рассчитывали изменение концентрации в сыворотке до инфузии для каждого пациента через 2 и 12 недель (А) Изменение концентрации VEGF; (В) изменение концентрации IL-8. Данные показывают группу плацебо (n=6), группу респондентов (R) [n=8 (2 недели) и 6 (12 недель)] и общую группу пациентов, получавших SEQ ID NO: 3 [n=14 (2 недели) и 12 (12 недель)], которые остались в исследовании через 12 недель.

Диапазон концентраций (все пациенты) VEGF, 4-195 пг/мл; и для IL-8, 0,7-19 пг/мл.

На Фигуре 14 показана повышенная экспрессия CD39, маркера повышенной функциональной эффективности регуляторных Т-клеток. Мононуклеарные клетки периферической крови пациента с RA помещали в культуру либо нестимулированными (незаштрихованные столбцы), либо с SEQ ID NO: 1 (10 пг/мл) (заштрихованные столбцы) или SEQ ID NO: 3 (10 мкг/мл) (черные столбцы). Через 24 часа, 48 часов или 72 часа клетки

удаляли из культуры и окрашивали с помощью панели меченых флуоресцеином антител к CD45, CD3, CD4, CD25, CD127 и CD39. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto (BD Biosciences). Результаты выражаются в виде среднего значения усиления флуоресценции (MFI) для: (A) клеток CD25hi и CD127lo после использования нескольких живых ворот для доступа к живым, CD45+,CD3+,CD4+ клеткам; (B) экспрессии CD39 популяцией CD45+CD3+CD4+CD25hiCD127lo в (A). (C) РВМС(10<sup>6</sup>/мл) были предварительно обработаны в течение 96 ч в культуре SEQ ID NO: 1 (10 или 0,1 мкг/мл) или SEQ ID NO: 3 в соответствии с изобретением (10 или 0,1 мкг/мл), промыты и добавлены к свежим аутологичным окрашенным CFSE Т-клеткам и стимулированы подложками, покрытыми анти-CD3 и анти-CD28 антителами. Соотношение предварительно обработанных Т-клеток к Т-клеткам респондеров составляло 1:10. Клетки анализировали на уменьшение CFSE MFI используя программное обеспечение Cellquest на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences) через 3 дня. Никакого ингибированного ответа не наблюдалось, когда Т-клетки были предварительно инкубированы с SEQ ID NO: 1, но наблюдалось снижение ответа до 30% для клеток, предварительно инкубированных с SEQ ID NO: 3. (D) В клиническом исследовании RAGULA образцы цельной крови от пациентов с ревматоидным артритом, получавших лечение плацебо и SEQ ID NO: 3, респондеров (R) или не отвечающих (NR) отслеживали на предмет изменения экспрессии CD39 на Treg-клетках (живые, CD45+CD3+CD4+CD25hi CD127lo) более 12 недель. Результаты выражаются в % изменения экспрессии клеточной поверхности в указанные моменты времени после предварительной инфузии. После однократной инфузии экспрессия CD39+ значительно повышалась в течение по меньшей мере 12 недель после инфузии.

На Фигуре 15 показаны результаты анализа проточной цитометрии экспрессии уровней белка CD115/c-Fms (A) и RANK (B) M-CSF-зависимыми предшественниками остеокластов человека, культивированных в отсутствие или в присутствии SEQ ID NO: 1 (2 мкг/мл) в течение 48 часов. Репрезентативные образцы, показывающие среднюю интенсивность флуоресценции: пунктирная линия, необработанный контроль; Жирная сплошная линия, активированный RANKL контроль; светлая сплошная линия, RANKL активированные клетки, обработанные SEQ ID NO: 3 (n=4). (C) Анализ qПЦР экспрессии c-fms и RANK после 48-часовой обработки мышинных M-CSF-зависимых предшественников остеокластов с помощью SEQ ID NO: 1 (2 мкг/мл). Данные показывают среднее ± стандартное отклонение повторяющихся экспериментов с использованием конкретных праймеров и нормированы на β-актин. \* p < 0,05.

(D) Вестерн-блоттинг, показывающий экспрессию pERK и pp38 в предшественниках остеокластов человека в ответ на RANKL (10 нг/мл) в течение указанного времени в клетках, культивируемых в отсутствие или в присутствии SEQ ID NO: 1 (2 мкг/мл, 48 ч). (E) Экспрессия RANKL-индуцированной pERK в культурах, содержащих зрелые остеокласты человека, культивируемые в отсутствие или в присутствии SEQ ID NO: 1 (2 мкг/мл, 48 ч) (F) Вестерн-блот-анализ, показывающий экспрессию факторов транскрипции c-Fos и NFATc1 в ответ на RANKL (10 нг/мл) в предшественниках остеокластов и зрелых

остеокластах, обработанных в отсутствие или в присутствии ВiР (2 мкг/мл). Общие ERK и p38 белки и GAPDH использовали в качестве контроля загрузки, как указано. \*  $p < 0,01$ . Это демонстрирует, что SEQ ID NO: 1 подавляет экспрессию CD115 и RANK на поверхности клеток и передачу сигналов в предшественниках остеокластов человека.

На Фигуре 16 показано, что SEQ ID NO: 3 ингибирует ядерную транслокацию NF- $\kappa$ B p65 и p52 в предшественниках остеокластов и моноцитах THP1 после стимуляции TNF $\alpha$  и RANKL. M-CSF-зависимые (A) предшественники остеокластов человека или (B) клетки THP-1 предварительно обрабатывали в течение 1 ч в отсутствие (Co) или в присутствии SEQ ID NO: 3 (10 мкг/мл) (A, B), а затем стимулировали TNF $\alpha$  (10 нг/мл) в течение 10 минут. (C) пре-остеокласты культивировали в присутствии или в отсутствие SEQ ID NO: 3 (10 мкг/мл) с RANKL (50 нг/мл) или без него в течение 4 часов. Клетки фиксировали и обрабатывали для проточной цитометрии, визуализации проточной цитометрии или конфокальной микроскопии после окрашивания на NF- $\kappa$ B p65 (A, B) или p52 (C) с помощью DAPI контрастного окрашивания. Панели справа от каждой части Фигуры показывают конфокальные изображения ядерной транслокации p65 и p52 в репрезентативной единичной клетке, демонстрируя отсутствие ядерной транслокации в клетках, обработанных SEQ ID NO: 3. \*  $p < 0,01$ ,  $n=3$ .

Фигура 17: после обработки SEQ ID NO: 3 или плацебо иммунный ответ пациентов измеряли с применением культуры РВМС, стимулированной для обнаружения ответов Т-клеток на максимальный стимул, подложек, покрытых анти-CD3 и анти-CD28 антителами (3-дневное культивирование) (Фигура 17A) или сенсibiliзирующих антигенов, туберкулина PPD (5-дневная культура) (Фигура 17B).

Активацию измеряли по поглощению меченого тритием тимидина за последние 24 часа культивирования.

На Фигуре 18A схематически представлен протокол и результаты эксперимента по трансплантации мышинной кожи.

На Фигуре 18B показан анализ выживаемости на графике Каплана-Мейера. Это демонстрирует, что SEQ ID NO: 3 увеличивает выживаемость 5/6 трансплантатов по сравнению с контрольной группой, при этом 50% трансплантатов выживают на приблизительно 30% более, чем трансплантаты контрольных мышей.

На Фигуре 19 представлена схема второго исследовательского эксперимента по трансплантации. Снова введение SEQ ID NO: 3 приводит к более длительному выживанию кожных трансплантатов по сравнению с животными, которым вводили модифицированные дендритные клетки (DC). Смешивание введения DC с SEQ ID NO: 3 не принесло пользы.

На Фигуре 20 показано производство цитокинов перипротезной тканью, культивированной с SEQ ID NO: 3 и без нее. Небольшие фрагменты одинакового размера были вырезаны из перипротезной ткани, взятой во время повторной операции после расшатывания протезного сустава и с полного информированного согласия пациентов. Ткань культивировали в течение 24-72 часов либо в отсутствие (контроль), либо в присутствии SEQ ID NO: 3 (20 мкг/мл). Цитокины, фактор некроза опухоли (TNF)  $\alpha$  или

интерлейкин (IL)10 количественно определяли с помощью коммерческого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (PharMingen, BD, Oxford, UK). Два графика показывают, что, хотя количество TNF $\alpha$  в контрольных культурах и культурах с SEQ ID NO: 3 показывает небольшое изменение во всех 4 культурах, наблюдается увеличение продукции IL-10.

### Примеры

#### **Пример 1: Получение белка в соответствии с данным изобретением**

Ген ViP был модифицирован для размещения His-метки на N-конце молекулы. Метка бх гистидина была расположена так, чтобы ее можно было удалить ферментативным расщеплением диаминопептидазой после аффинной очистки белка на кобальтовой колонке. Никель не использовался, поскольку никель мог вызвать аллергическую реакцию, если его оставалось достаточно для загрязнения препарата. Для эффективного удаления эндотоксина применяли комбинацию температурных изменений и детергента.

#### **Выход и очистка**

Благодаря съемной системе His-метки значительно улучшается как выход, как и чистота белка.

**Таблица 1: Выход SEQ ID NO: 3 из бактериального осадка:**

<b>Момент времени</b>	<b>Масса используемой гранулы (г)</b>	<b>ViP (SEQ ID NO:3) Выход (мг/г)</b>
<b>День 0</b>	2,4г	19,6
<b>2 месяца</b>	60г	31,9
<b>8 месяцев</b>	2,4г	24,2

**Таблица 2: Чистота и выход SEQ ID NO: 3**

<b>Тест</b>	<b>Результат</b>
Концентрация белка	5,45 мг/мл
Эндотоксин	1,51 EU на мг белка
Тест целостности фильтра, использованного для стерильной фильтрации лекарственного вещества	3900 мБар
Бионагрузка	Рост отсутствует

#### **Сравнительный пример; подготовка SEQ ID: NO 7**

Во время разработки белка, в соответствии с данным изобретением, было решено, что молекула должна иметь правильную последовательность KDEL на C' конце и не должна иметь никакой другой метки, прикрепленной к белку. Этот белок был получен в соответствии со стандартными рекомбинантными методами, известными специалисту в данной области техники. Однако белка было слишком мало, чистота была слишком низкой, и почти вся биологическая активность была потеряна. Соответственно, белок нельзя было

использовать.

SEQ ID NO: 7 соответствует SEQ ID NO: 1 (SEQ1 из WO00/21995) с удаленной His-меткой и восстановленной аминокислотной последовательностью KDEL, но без других изменений от SEQ1 из WO00/21995. Этот белок оказалось очень трудно очистить, конечная чистота белка была <90%, а нагрузка эндотоксина была слишком высокой для клинического применения. Это демонстрирует, что трудно обеспечить аналог нативного ViP, который был бы легко получен, стабилен и обладал биологической активностью, а также подходил бы для введения людям.

Были подготовлены четыре пробные партии, чтобы попытаться улучшить выход, чистоту и снижение эндотоксинового загрязнения чистого белка. Это оказалось невозможным. Восстановление белка составило приблизительно 1%, но уровень эндотоксина оставался высоким.

### **Пример 2**

Сравнение продукции TNF $\alpha$ , индуцированной белками SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 1, представлено на Фигуре 10. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от 4 здоровых контролей (заштрихованные обозначения) и 1 пациента с ревматоидным артритом (незаштрихованные обозначения) культивировали в течение 24 часов в присутствии SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Цитокины, продуцируемые в супернатанте, были дефектны и количественно определены с помощью ELISA.

Производство TNF $\alpha$  PBMC значительно снижается в присутствии SEQ ID NO: 3 по сравнению с SEQ ID NO: 1. Дополнительно, белок в соответствии с данным изобретением не увеличивает выработку TNF $\alpha$  PBMC ревматоидного артрита в отличие от здоровых контролей, тогда как белок SEQ ID NO: 1, по-видимому, индуцирует большую продукцию TNF $\alpha$  посредством PBMC RA, чем здоровые PBMC.

Клиническое значение TNF $\alpha$  в патогенезе ревматоидного артрита (РА) хорошо установлено (см. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics, Feldmann M, Maini SR, Immunol Rev. 2008 Jun;223:7-19). Следовательно, важным позитивным признаком белка, в соответствии с данным изобретением, является то, что он не повышает регуляцию TNF $\alpha$ .

### **Пример 3**

Взаимодействие между молекулами, которые регулируют активацию Т-клеток, является сложным, но поскольку ревматоидный артрит является заболеванием хронического воспаления, эти молекулы и их относительная экспрессия важны. Лейкоцитарный антиген человека - связанный с антигеном D (HLA-DR) представляет собой молекулу, конститутивно экспрессируемую моноцитами, макрофагами и дендритными клетками, обычно известными как антигенпрезентирующие клетки, каждая из которых содержит антигенный пептид, готовый к представлению рецептору CD4+Т-клеток.

Однако для полной активации Т-клеток требуются два сигнала: один через лигирование клеточного рецептора HLA-DR-Т и одновременный второй сигнал через CD28 через лигирование CD86 или CD80. Второй сигнал обеспечивается костимулирующими

молекулами CD86 и/или CD80, также экспрессируемыми антигенпрезентирующими клетками, первоначально связывающимися с CD28, экспрессируемыми Т-лимфоцитами CD4, которые позже подавляются, в то время как CTLA-4 положительно регулируется. Активация Т клетки регулируется экспрессией этих молекул. CD28 дает положительный сигнал активации, в то время как CTLA-4 дает отрицательный сигнал Т клетке. CTLA-4 также связывает CD80 и CD86 с большей авидностью, чем CD28, это имеет эффект ингибирования активации Т-клеток, таким образом предотвращая хроническую или продолжающуюся активацию Т-клеток.

Взаимодействие этих четырех молекул помогает регулировать иммунный ответ. Таким образом, примечательно, что SEQ ID NO: 1 показывает негативную регуляцию CD86, а также HLA-DR. Это действовало на снижение активации Т-клеток, что иллюстрируется сниженным *in vitro* ответом PBMC, не обработанных ViP, на сенсibiliзирующий антиген, такой как туберкулин PPD, но также сигнализирует о возможности генерализованной иммуносупрессии, которая не будет клинически эффективной в долгосрочной перспективе (Michael Dandel, Hans Brendan Lehmkuhl, Christoph Knosalla, Roland Hetzer, Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation, *Transplant Immunology*; Volume 23, Issue 3, July 2010, Pages 93-103), см. Фигуру 11D. Напротив, SEQ ID NO: 3 в соответствии с изобретением не вызывал значительной потери экспрессии HLA-DR (Фигура 11E) и CD86.

На Фигуре 11 показаны результаты экспериментов по проточной цитометрии на клетках CD14+. В присутствии SEQ ID NO: 3 (Фигура 11 B) наблюдается увеличение экспрессии CD80 и увеличение CD86 по сравнению с нестимулированными клетками (Фигура 11 A).

В присутствии SEQ ID NO: 1 (Фигура 11 C) наблюдается увеличение экспрессии CD80, но не CD86, по сравнению с непростимулированными клетками.

В заключение следует отметить два важных момента. Во-первых, хотя снижение Т-клеточной активации уменьшит воспаление, как видно из SEQ ID NO: 1, общее подавление иммунной системы не приносит пользы пациенту в долгосрочной перспективе, что приводит к увеличению инфекции и т.д. Во-вторых, SEQ ID NO: 3 в соответствии с данным изобретением уже продемонстрировала противовоспалительную эффективность на моделях *in vivo*. Это демонстрирует модуляцию иммунной системы для устранения хронического воспаления за счет специфической активности ViP, избегая генерализованного иммуносупрессивного эффекта.

#### **Пример 4: Клинические данные**

Результаты рандомизированного плацебо-контролируемого двойного слепого клинического исследования I/II фазы с возрастающей дозой у пациентов с активным РА, не прошедших принятую терапию, показали, что белок в соответствии с данным изобретением безопасен. Дополнительно, анализ биомаркеров показал значительную противовоспалительную активность с клинической пользой (см. Kirkham B, Chaabo K, Hall

C, Garrood T, Mant T, Allen E, et al. Safety and patient response as indicated by biomarker changes to binding immunoglobulin protein in the phase I/IIA RAGULA clinical trial in rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 2016;55:1993-2000). Двадцать четыре пациента с активным РА, которые не реагировали на лечение одним или более модифицирующими болезнь противоревматическими препаратами (DMARD), были последовательно разделены на три группы, каждая из восьми пациентов, случайным образом распределенных для приема плацебо (два пациента) или белка SEQ ID NO: 3 в соответствии с данным изобретением (шесть пациентов) в дозах 1, 5 или 15 мг. Пациенты получали однократную внутривенную инфузию в течение 1 ч и наблюдались в стационаре в течение ночи. Пациенты находились под наблюдением в течение следующих 12 недель с последующей клинической и лабораторной оценкой безопасности, эффективности (DAS28-СОЭ) и анализа биомаркеров.

### **Безопасность**

Не было отмечено никаких инфузионных реакций или серьезных побочных реакций на лекарственные средства. Нежелательные явления были равномерно распределены между группами плацебо и активными группами без токсичности, связанной с лекарственными средствами. Гематологические, почечные и метаболические параметры не показали токсичности, связанной с лекарственным средством.

### **Эффективность**

Шкала активности заболевания (DAS28) была разработана в качестве инструмента динамической оценки и меры терапевтического ответа для применения в клинических испытаниях и на практике. DAS28-СОЭ использует следующие индикаторы заболевания: количество болезненных суставов (28 суставов), количество опухших суставов (28 суставов), скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и общее состояние здоровья, сообщаемое пациентом, по визуальной аналоговой шкале 100 мм, см. Prevoo, ML et al, *Arthritis Rheum* 1995; 38: 44-8.

Основной конечной точкой эффективности был ответ DAS28-СОЭ, классифицированный в соответствии с критериями ответа EULAR на хороший, средний ответ и на отсутствие ответа с ремиссией, определяемой как DAS28-СОЭ менее 2,6 (Kirkham B, Chaabo K, Hall C, Garrood T, Mant T, Allen E, et al. Safety and patient response as indicated by biomarker changes to binding immunoglobulin protein in the phase I/IIA RAGULA clinical trial in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2016;55:1993-2000). Конечными точками биологической эффективности были изменения CRP (Фигура 12), IL-8 и VEGF (Фигура 13), см. дальнейшее обсуждение ниже. Они обычно применяются для мониторинга активности заболевания в клинических испытаниях лекарственных препаратов для лечения ревматоидного артрита.

Клинически, хорошие ответы EULAR чаще встречались у тех, кто получал более высокие дозы SEQ ID NO: 3, с устойчиво низкими показателями DAS28 (от 3 до 12 недель), наблюдаемыми у трех пациентов, получивших SEQ ID NO: 3, по сравнению с пациентами, которые получали плацебо, хотя хорошие ответы DAS28-СОЭ были достигнуты во всех

группах лечения.

### **Концентрация VEGF и IL-8 в сыворотке**

На Фигуре 13 показано изменение сывороточных уровней VEGF или IL-8 в присутствии SEQ ID NO: 3 от исходного уровня до инфузии для каждого пациента через 2 недели или 12 недель, измеренные с помощью технологии Luminex (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK).

В этот анализ были включены только пациенты, оставшиеся в исследовании через 12 недель (Фигура 13).

Анализ CRP, VEGF и IL-8 оказался подходящим для дифференциации субъектов, получающих активное лекарство, по сравнению с плацебо. Пациенты, ответившие на SEQ ID NO: 3, показали значительное снижение CRP через 2 недели (уровень до инфузии,  $12,7 \pm 1,7$  по сравнению с уровнем после 2 недель после инфузии,  $7,1 \pm 2,1$ ;  $p=0,02$ ), по сравнению с группой плацебо и группой не-респондентов. Сывороточные VEGF и IL-8 являются общими биомаркерами, применяемыми в клинических испытаниях, поскольку они хорошо коррелируют с измерением синовита и инфильтрации моноцитов соответственно. Значительные изменения уровней этих биомаркеров произошли в группах пациентов, получавших SEQ ID NO: 3. Кроме того, биомаркеры не подтверждали клиническое улучшение у пациентов, получавших плацебо. Поразительно, что на 12-й неделе значительно меньшее количество пациентов, получавших плацебо, показало снижение сывороточного VEGF и IL-8 (17 и 50% соответственно) по сравнению с группой респондентов SEQ ID NO: 3 (71 и 83% пациентов соответственно). Интересно, что даже группа не ответивших на SEQ ID NO: 3 показала снижение сывороточных концентраций (66 и 83% пациентов, соответственно), что свидетельствует об изменении патологии их заболевания. Таким образом, пациенты с активным ответом показали значительно более низкие сывороточные концентрации CRP через 2 недели после инфузии по сравнению с уровнями до инфузии (Фигура 12), а также VEGF и IL-8 (Фигура 13) из группы плацебо.

Это указывает на то, что воспаление при заболевании значительно меньше, чем до инфузии.

### **Пример 5: SEQ ID NO: 3 положительно регулирует CD39 на регуляторных Т-клетках.**

Мононуклеарные клетки периферической крови пациента с RA были помещены в культуру либо нестимулированными (незаштрихованные столбцы), либо с SEQ ID NO: 1 (10 мкг/мл) (заштрихованные столбцы) или SEQ ID NO: 3 (10 мкг/мл) (черные столбцы, Фигура 14).

Через 24 часа, 48 часов или 72 часа клетки удаляли из культуры и окрашивали панелью меченых флуоресцеином антител на CD45, CD3, CD4, CD25, CD127 и CD39. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto (BD Biosciences).

Результаты на Фигуре 14 выражены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для:

(A) Клеток CD25<sup>hi</sup> и CD127<sup>lo</sup> после использования нескольких живых ворот для

доступа

живых, CD45 +, CD3 +, CD4+клеток;

(B) экспрессии CD39 в популяции CD45+CD3+CD4+CD25hiCD127lo в (A).

(C) PBMC ( $10^6$ /мл) предварительно обрабатывали в течение 96 часов в культуре с SEQ ID NO: 1 (10 или 0,1 мкг/мл) или SEQ ID NO: 3 в соответствии с изобретением (10 или 0,1 мкг/мл), промывали и добавляли к свежим аутологичным окрашенным CFSE (цитоплазматический краситель сложный эфир карбоксифлуоресцеиндиацетата и сукцинимидила) Т-клеткам и стимулировали подложками, покрытыми анти-CD3 и анти-CD28 антителами. Соотношение предварительно обработанных Т-клеток к респондерным Т-клеткам составляло 1:10.

Клетки анализировали на уменьшение CFSE MFI с использованием программного обеспечения Cellquest на FACS Calibur через 3 дня. По мере пролиферации клеток содержание CFSE уменьшается при каждом делении, и клетки, которые не пролиферируют, остаются сильно окрашенными.

(D) В клиническом испытании образцы цельной крови пациентов с ревматоидным артритом, принимавших плацебо и SEQ ID NO: 3, респондеров (R) или не-респондеров (NR), отслеживали на предмет изменения экспрессии CD39 на Трег-клетках (живые, CD45+CD3+CD4+CD25hi CD127lo) в течение 12 недель. Результаты выражали в % изменения экспрессии клеточной поверхности в указанные моменты времени от предварительной инфузии.

Сравнение *in vitro* между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 в соответствии с данным изобретением показывает, что, хотя фактическое увеличение числа Трег является низким, таким образом подтверждая предыдущие исследования SEQ ID NO: 1, существует большая разница в % экспрессии CD39 на Трег с SEQ ID NO: 3 при прямом сравнении с SEQ ID NO: 1. Интересно, что через 72 часа экспрессии CD39 на Трег из культур с SEQ ID NO: 1 ниже, чем у контрольных клеток. В клинике наблюдалось значительное увеличение экспрессии CD39 на Трег-клетках у пациентов, отвечающих на SEQ ID NO: 3, и это сохранялось в течение 12 недель после инфузии.

#### **Пример 6: SEQ ID NO: 3 подавляет сигнальные пути дифференцировки остеокластов**

Чтобы исследовать механизмы, лежащие в основе ингибирования остеокластогенеза с помощью SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, мы проанализировали специфические сигнальные пути цитокинов и нижестоящие сигнальные пути, которые, как известно, имеют важное значение для дифференциации остеокластов. Проточно-цитометрический анализ CD115/c-Fms и RANK, рецепторов для M-CSF и RANKL, соответственно, в M-CSF-зависимых предшественниках остеокластов, полученных из периферической крови человека, показал, что SEQ ID NO: 3 подавляет экспрессию CD115 на  $63 \pm 16\%$  (диапазон ингибирования 43-79%) (Фигура 15A). SEQ ID NO: 1 аналогичным образом ингибирует экспрессию белка RANK на  $51 \pm 29\%$  (диапазон ингибирования 22-90%) (Фигура 15B). Ингибирование экспрессии c-Fms и RANK также наблюдалось на уровне мРНК, поскольку

анализ qPCR показал значительное снижение c-fms и RANK РНК (Фигура 15C). Чтобы выяснить, приводит ли снижение экспрессии рецептора к снижению чувствительности к остеокластогенным цитокинам, мы проанализировали влияние обработки SEQ ID NO: 1 на RANKL-зависимую передачу сигналов MAPK. Предварительная обработка предшественников остеокластов, полученных из PBMC человека, с помощью SEQ ID NO: 1 заметно подавляла индуцированное RANKL фосфорилирование ERK и p38 по сравнению с необработанными клетками (Фигура 15D). Подобные результаты были получены с применением M-CSF-зависимых предшественников остеокластов, полученных из костного мозга мыши (данные не показаны).

Дальнейшее изучение чувствительности к RANKL в культурах поздней стадии аналогичным образом показало, что уровни pERK, индуцированные RANKL, также были ослаблены в культурах, обогащенных зрелыми остеокластами после обработки SEQ ID NO: 1 (Фигура 15E).

Затем мы исследовали влияние SEQ ID NO: 1 на экспрессию факторов транскрипции c-Fos и NFATc1, которые необходимы для дифференциации остеокластов и лежат ниже передачи сигналов RANK и TNF $\alpha$  в предшественниках остеокластов и моноцитах. Предварительная инкубация предшественников остеокластов человека с SEQ ID NO: 1 значительно снижала активацию белка c-Fos после обработки RANKL (Фигура 15F). Стимуляция RANKL NFATc1, гена-мишени c-Fos, аналогичным образом блокировалась в предшественниках остеокластов, обработанных SEQ ID NO: 1, по сравнению с лизатами контрольных клеток (Фигура 15F). Зрелые культуры остеокластов, обработанные SEQ ID NO: 1, также показали заметное снижение эндогенной экспрессии факторов транскрипции c-Fos и NFATc1 (Фигура 15F).

Поскольку SEQ ID NO: 1 ингибирует сигнальные пути, необходимые для дифференцировки моноцитов в остеокласты, мы попытались выяснить, будет ли SEQ 3 иметь аналогичный эффект на NF- $\kappa$ B, один из факторов транскрипции, который вызывает воспаление, но для этого требуется альтернативный маршрут RANK-RANKL для запуска лежащих ниже дифференциаций.

Проточная цитометрия с визуализацией продемонстрировала, что обработка SEQ ID NO: 3 ингибировала TNF $\alpha$ -индуцированную ядерную транслокацию p65 NF- $\kappa$ B в предшественниках остеокластов (Фигура 16A). Сходные результаты были получены в ответ на стимуляцию RANKL (данные не показаны). Поскольку RANKL также стимулирует клетки через неканонический путь NF- $\kappa$ B, мы исследовали ядерную транслокацию p52 NF- $\kappa$ B после стимуляции RANKL. Конфокальная микроскопия и анализ изображений показали, что, хотя RANKL стимулировал эффективную ядерную транслокацию p52 в необработанных клетках, это ингибировалось предварительной обработкой SEQ ID NO: 3 (Фигура 16B). Эти результаты показывают, что SEQ ID NO: 3 блокирует как каноническую, так и неканоническую передачу сигналов NF- $\kappa$ B в моноцитах и предшественниках остеокластов после обработки TNF $\alpha$  и RANKL.

Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что обработка моноцитов и

предшественников остеокластов SEQ ID NO: 3 снижает индуцированную M-CSF и RANKL передачу сигнала и активацию основных остеокластогенных факторов транскрипции NF-κB, c-Fos и NFATc1, тем самым обеспечивая понимание механизмов, посредством которых SEQ ID NO: 3 ингибирует дифференцировку остеокластов и резорбтивную активность. Эти данные свидетельствуют о том, что SEQ ID NO: 3 можно применять для лечения заболеваний, связанных с нарушением регуляции метаболизма костей.

#### **Пример 7**

После лечения SEQ ID NO: 3 или обработки плацебо иммунный ответ пациентов измеряли с применением культуры PBMC, стимулированной для выявления ответов T-клеток на максимальный стимул, подложек, покрытых анти-CD3 и анти-CD28 антителами (3-дневное культивирование) (Фигура 17A) или сенсибилизирующим антигеном, туберкулином PPD (5-дневная культура) (Фигура 17B).

Активацию измеряли по поглощению меченого тритием тимидина пролиферирующими клетками в течение последних 24 часов культивирования. Данные показывают отсутствие изменений в ответе на митоген или сенсибилизирующий антиген в течение 12 недель клинического испытания. Это указывает на то, что SEQ ID NO: 3 не оказывает общего иммуносупрессивного действия, в отличие от SEQ ID NO: 1, которая уже была опубликована как уменьшающая ответ антигена отзыва на туберкулин PPD (Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS. The stress protein, BiP, stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express an anti-inflammatory cytokine profile and to inhibit antigen presenting cell function: relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1167-1171).

#### **Пример 8: Трансплантация; Мышиная модель кожных трансплантатов**

На Фигуре 18 схематично представлены протокол и результаты эксперимента по трансплантации мышинной кожи. Всем мышам-реципиентам вводили анти-CD8 антитело для истощения эндогенных дендритных клеток за восемь дней до трансплантации. В каждой из четырех групп было по 6 мышей. За семь дней до трансплантации контрольные мыши получали только основу. SEQ ID NO: 3 (20 мкг/мышь) вводили внутривенно. Две другие группы получали незрелые или зрелые плазмациитоидные дендритные клетки от мышей, соответствующих H2Kb. Через 1 неделю небольшие кусочки кожи с хвоста мышей с несовпадающим H2Kd пересаживали на спину мышей-реципиентов.

Анализ выживаемости трансплантатов по графику Каплана-Мейера показывает, что SEQ ID NO: 3 увеличивает выживаемость 5/6 трансплантатов по сравнению с контрольной группой, при этом 50% трансплантатов выживают примерно на 30% дольше, чем трансплантаты контрольных мышей.

Представленные данные показывают, что SEQ ID NO: 3 эффективна для поддержания выживаемости трансплантата в мышинной модели кожных трансплантатов, модели, которая считается очень сложной для поддержания выживаемости трансплантата.

Также был проведен второй исследовательский эксперимент по трансплантации (см. Фигуру 19). Опять же, введение SEQ ID NO: 3 приводит к более длительному выживанию

кожных трансплантатов по сравнению с животными, которым вводили модифицированные дендритные клетки (DC). Смешивание введения DC с SEQ ID NO: 3 не принесло положительных результатов.

### **Пример 9: Расшатывание протезного сустава**

При расшатывании протеза ткань, которая образуется вокруг протезных суставов, перипротезная ткань, очень похожа на синовиальную оболочку, которая воспаляется во время RA. Эта ткань может вызвать расшатывание протеза. Перипротезная ткань (PPT) была собрана во время ревизионной операции для замены протеза сустава. Ткань разрезали на небольшие кусочки равной массы и культивировали в течение ночи в среде для культивирования тканей (1 мл) в 24-луночных планшетах в присутствии или в отсутствие SEQ ID NO: 3. Супернатанты культур собирали между 24 и 72 часами, и TNF $\alpha$ , провоспалительные цитокины или интерлейкин-10, противовоспалительные цитокины определяли количественно с помощью коммерческого иммуноферментного анализа (ELISA) (PharMingen, BD, Oxford, UK).

На Фигуре 20 показано, что, хотя белок, в соответствии с данным изобретением, мало влияет на производство TNF $\alpha$ , уровень IL-10 заметно увеличивается.

Данные, предоставленные изобретателями, демонстрируют, что SEQ ID NO:3 обладает значительным противовоспалительным действием. Это указывает на то, что SEQ ID NO: 3 можно применять для лечения воспалительного заболевания кишечника, например болезни Крона.

### **Пример 10**

В Таблицах 4 и 5 суммированы физические и функциональные различия между белком в соответствии с данным изобретением, SEQ ID NO: 1, и нативным BiP. Это четко резюмирует значительные различия между белком, в соответствии с данным изобретением, ранее опубликованным рекомбинантным BiP SEQ ID NO: 1 и нативным белком.

**Таблица 4**

	Источник белка	Наружный вид молекулы	Гликолизирование	5'концевая последовательность	3'концевая последовательность	Поверхностная экспрессия
<b>Нативный внутриклеточный</b>	Человек	Моно олиго	- Присутствует	EEED	KDEL	Отсутствует
<b>SEQ ID NO: 1</b>	Бактерия	Моно	Отсутствует	MEED	LHHHH	н/д

	льный	(10%)	ет		НН	
		<димер				
		(90%)				
<b>SEQ ID NO: 3</b>	Бактериа льный	Мономер	Отсутству ет	<b>RAEEE</b> <b>D</b>	<b>KDEL</b>	н/д

Белок	Белковая функция													
	Источник белка	Производство TNF	Производство IL-10	Экспрессия CD86	HLA-DR экспрессия	Влияние на ответ туберкулиновых PPD Т клеток	Введение Treg	Индукция IDO+ DC	NFκB активация в различных клетках	CIA терапия	Восстановление от артрита (CIA)	Ингибирование дифференцировки и функции остеокластов	Производство IFNγ (CIA)	Производство IFNγ (клиническое исследование)
SEQ ID NO: 1	Бактериальный	++	+++	⇕	⇕	⇕	+ CTLA-4 + CD39CD4	++	↓	Да	Да*	Да	↔	
SEQ ID NO: 3	Бактериальный	±	+	↔	↔	↔	+ CTLA-4 ++CD39 CD4CD25hi CD127lo		⇕	Да	Да** Клиниче ское исследо	Да		⇕

							+++CD39 CD4CD25hi CD127lo клиник.				вание ремисси я			
*усовершенствованная коллагеновая модель тяжелого артрита n=1; ** уменьшение DAS28 в клиническом исследовании, CIA=коллаген-индуцированный артрит														

Таблица 5

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный или рекомбинантный белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID: NO: 4.
2. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1, содержащий примеси эндотоксина в количестве менее чем 50 единиц эндотоксина на мг белка, необязательно менее чем 25 единиц эндотоксина на мг белка или менее чем 2 единицы эндотоксина на мг белка.
3. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что белок негликолизирован.
4. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID: NO. 4.
5. Выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID: NO 8.
6. Рекомбинантный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 4 или п. 5.
7. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1 или п. 2 для применения в медицине или ветеринарной медицине.
8. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1 или п. 2, для применения при лечении и/или профилактике воспалительного состояния, необязательно у субъекта, представляющего собой человека.
9. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 8 для применения по п. 8, отличающийся тем, что лечение и/или профилактика воспалительного состояния достигаются без значительной иммуносупрессии.
10. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 8 для применения по п. 9, отличающийся тем, что лечение и/или профилактика воспалительного состояния достигаются без значительной иммуносупрессии в соответствии с измерениями Т-лимфоцитной активности относительно активности до введения белка.
11. Выделенный или рекомбинантный белок по любому из пп. 8-10 для применения по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что воспалительное состояние выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, отторжения трансплантата органа, кожи, ткани, крови, сыворотки, плазмы или клеток, или воспалительного заболевания кишечника, такого как болезнь Крона.
12. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 11 для применения по п. 10, отличающийся тем, что воспалительное состояние выбрано из ревматоидного артрита, псориатического артрита или ювенильного идиопатического артрита.
13. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1 или п. 2 для применения при лечении или профилактике заболеваний нарушения регуляции костного метаболизма, необязательно остеопороза, потери костной массы, костной резорбции, болезни Паджета,

рака кости, рака молочной железы или потери костной массы, связанной с раком.

14. Выделенный или рекомбинантный белок по п. 1 или п. 2, для применения в профилактике расшатывания костных протезов.

15. Выделенный или рекомбинантный белок по любому из пунктов 8-14 для применения по любому из пп. 8-14, причем указанное применение включает введение белка в дозе от 1 мг до 1г.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный или рекомбинантный белок, по любому из предшествующих пунктов, и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей, адъювантов или носителей.

17. Выделенный или рекомбинантный белок по любому из пп. 1-15 или фармацевтическая композиция по п. 16 для применения у людей.

18. Фармацевтическая композиция по п. 16 или п. 17, содержащая забуференный фосфатом солевой раствор при pH 7,2-7,6.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-18, содержащая выделенный или рекомбинантный белок в количестве от 2,0 до 50,0 мг/мл.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, содержащая выделенный или рекомбинантный белок в количестве приблизительно 5,0 мг/мл.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-20, подходящая для внутривенного введения.

22. Способ лечения и/или профилактики состояния, по любому из предшествующих пунктов, у пациента, включающий стадию введения пациенту, который нуждается в этом, эффективного количества выделенного или рекомбинантного белка, по любому из предшествующих пунктов, или фармацевтической композиции, по любому из пунктов 16-21.

23. Выделенный или рекомбинантный белок, выделенный или рекомбинантный белок для применения, фармацевтическая композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что пациенту дополнительно вводят один или более терапевтических агентов, или пептиды представлены в комбинации с одним или более терапевтическими агентами.

24. Выделенный или рекомбинантный белок, выделенный или рекомбинантный белок для применения, фармацевтическая композиция или способ по п. 23, отличающиеся тем, что терапевтический агент выбран из агентов, модифицирующих заболевание, анальгетиков, противовоспалительных агентов, иммунотерапевтических агентов, антибиотиков, антител и стероидов.

25. Способ получения рекомбинантного белка, состоящего из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3, включающий:

трансформацию микроорганизма рекомбинантным вектором, как определено в п.6;  
культивирование микроорганизма, приводящее к получению белка в соответствии с SEQ ID NO: 4;

лизирование микроорганизмов для высвобождения белка;

обработку лизата детергентом для удаления эндотоксина;  
выделение и очистку белка с использованием афинной хроматографии с иммобилизованным металлом, где иммобилизованный металл представляет собой кобальт;  
и

приведение очищенного белка в контакт с ферментом диаминопептидазой, где диаминопептидаза отщепляет гистидиновую метку от N-конца белка; и  
разделение расщепленного белка и гистидиновой метки.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что микроорганизм представляет собой бактерию, необязательно *Escherichia coli*.

27. Способ по п. 25 или п. 26, отличающийся тем, что способ включает одну или более дополнительных стадий обработки белка детергентом для удаления эндотоксина.

28. Способ по любому из пп. 25-27, отличающийся тем, что способ предназначен для получения белка, имеющего менее чем 25 единиц эндотоксина на мг белка, необязательно менее чем 2 единицы эндотоксина на мг белка.

29. Способ по любому из пп. 25-28, отличающийся тем, что стадию ж) проводят с использованием афинной хроматографии с иммобилизованным металлом, где иммобилизованный металл представляет собой кобальт.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что детергент представляет собой 1,1,3,3-(тетраметилбутил)фенил-полиэтиленгликоль.

31. Способ по любому из пп. 25-30, отличающийся тем, что способ дополнительно включает одну или более из стадий фильтрации, очистки или концентрирования.

32. Способ по любому из пп. 25-31, отличающийся тем, что способ не включает более одной стадии замораживание-оттаивание.

33. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что микроорганизм культивируют в среде, не содержащей продукты животного происхождения.

34. Способ получения рекомбинантного белка, состоящего из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3, включающий применение небактериальных клеток-хозяев.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что белок получают с применением клеток, полученных от дрожжей, насекомых или грибов.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что белок получают с применением клеток млекопитающих.

По доверенности

**Аминокислотная последовательность нативного ВiP**

MKLSLVAAML LLLSAARAE EDKKEDVGTV VGIDLGTTYS CVGVFKNGRV EIIANDQGNR  
ITPSYVAFTP EGERLIGDAA KNQLTSNPEN TVFDAKRLIG RTWNDPSVQQ DIKFLPFKVV  
EKKTKPYIQV DIGGGQTKTF APEEISAMVL TKMKETAAY LGKKVTHAVV TVPAYFNDAQ  
RQATKDAGTI AGLNVMRIIN EPTAAAIAYG LDKREGEKNI LVFDLGGGTF DVSLLTIDNG  
VFEVVATNGD THLGGEDFDQ RVMEHFIKLY KKKTGKDVRK DNRAVQKLRR EVEKAKRALS  
SQHQARIEIE SFYEGEDFSE TLTRAKFEEL NMDLFRSTMK PVQKVLESD LKKS DIDEIV  
LVGGSTRIPK IQQLVKEFFN GKEPSRGINP DEAVAYGAAV QAGVLSGDQD TGDVLVLLDVC  
PLTLGIETVG GVMTKLIPRN TVVPTKKSQI FSTASDNQPT VTIKVYEGER PLTKDNHLLG  
TFDLTGIPPA PRGVPQIEVT FEIDVNGILR VTAEDKGTGN KNKITITNDQ NRLTPEEIER  
MVNDAEKFAE EDKCLKERID TRNELESYAY SLKNQIGDKE KLGKLSSED KETMEKAVEE  
KIEWLESHQD ADIEDFKAKK KELEEIVQPI ISKLYGSAGP PPTGEEDTAE KDEL

SEQ ID NO: 5

**ФИГ. 1**

**Первичная нуклеотидная последовательность нативного ViP**

1 aggtcgacgc cggccaagac agcacagaca gattgaccta ttggggtggt tcgcgagtgt  
61 gagaggggaag cgccgcggcc tgtatttcta gacctgcctc tcgcctgggt cgtggcgcct  
121 tgtgaccccc ggccccctgcc gctgcaagt cggaattgc gctgtgctcc tgtgctacgg  
181 cctgtggctg gactgcctgc tgctgcccc ctggctggca agatgaagct ctccctggtg  
241 gccgcgatgc tgctgctgct cagcgcggcg cgggccgagg aggaggaca gaaggaggac  
301 gtgggcacgg tggtcggcat cgacttgggg accacctact cctgcgtcgg cgtgttcaag  
361 aacggccgcg tggagatcat cgccaacgat cagggcaacc gcatcacgcc gtcctatgtc  
421 gccttcactc ctgaagggga acgtctgatt ggcgatgcc ccaagaacca gctcacctcc  
481 aacccccgaga acacggtctt tgacgccaa cggtcatcg gccgcacgtg gaatgacccg  
541 tctgtgcagc aggacatcaa gttcttgccg ttcaagggtg ttgaaaagaa aactaaacca  
601 tacattcaag ttgatattgg aggtgggcaa acaaagacat ttgctcctga agaaatttct  
661 gccatgggtc tcaactaaaat gaaagaaacc gctgaggctt atttgggaaa gaaggttacc  
721 catgcagttg ttactgtacc agcctatttt aatgatgcc aacgccaaagc aaccaaaagc  
781 gctggaacta ttgctggcct aatggttatg aggatcatca acgagcctac ggcagctgct  
841 attgcttatg gcctggataa gaggagggg gagaagaaca tcctggtggt tgacctgggt  
901 ggcggaacct tcgatgtgtc tcttctcacc attgacaatg gtgtcttcga agttgtggcc  
961 actaatggag atactcatct gggaggagaa gactttgacc agcgtgtcat ggaacacttc  
1021 atcaaactgt acaaaaagaa gacgggcaaa gatgtcagga aggacaatag agctgtgcag  
1081 aaactccggc gcgaggtaga aaaggccaag gccctgtctt ctacagcatca agcaagaatt  
1141 gaaattgagt cttctatga aggagaagac ttttctgaga cctgactcg ggccaaattt  
1201 gaagagctca acatggatct gttccggtct actatgaagc ccgtccagaa agtgttggaa  
1261 gattctgatt tgaagaagtc tgatattgat gaaattgttc ttggttggtg ctcgactcga

**ФИГ. 2**

1321 attccaaaga ttcagcaact ggttaaagag ttcttcaatg gcaaggaacc atcccgtggc  
1381 ataaaccag atgaagctgt agcgtatggg gctgctgtcc aggctgggtg gctctctggg  
1441 gatcaagata caggtgacct ggtactgett catgtatgtc cccttacct tggattgaa  
1501 actgtaggag gtgtcatgac caaactgatt ccaagtaata cagtgggtgcc taccaagaac  
1561 tctcagatct tttctacagc ttctgataat caaccaactg ttacaatcaa ggtctatgaa  
1621 ggtgaaagac ccctgacaaa agacaatcat cttctgggta catttgatct gactggaatt  
1681 cctcctgctc ctcgtggggg cccacagatt gaagtcacct ttgagataga tgtgaatggg  
1741 attcttcgag tgacagctga agacaagggg acaggaaca aaaataagat cacaatcacc  
1801 aatgaccaga atcgctgac acctgaagaa atcgaaagga tggttaatga tgctgagaag  
1861 tttgctgagg aagacaaaaa gctcaaggag cgcattgata ctagaaatga gttggaagc  
1921 tatgcctatt ctctaaagaa tcagattgga gataaagaaa agctgggagg taaactttcc  
1981 tctgaagata aggagaccat ggaaaaagct gtagaagaaa agattgaatg gctggaagc  
2041 caccaagatg ctgacattga agacttcaaa gctaagaaga aggaactgga agaaattggt  
2101 caaccaatta tcagcaaaact ctatggaagt gcaggccctc cccaactgg tgaagaggat  
2161 acagcagaaa aagatgagtt gtagacactg atctgctagt gctgtaatat tgtaaatact  
2221 ggactcagga acttttggtt ggaaaaaatt gaaagaactt aagtctcgaa tgtaattgga  
2281 atcttcacct cagagtggag ttgaactgct atagcctaag cggctgttta ctgcttttca  
2341 ttagcagttg ctcacatgtc tttgggtggg gggggagaag aagaattggc catcttaaaa  
2401 agcgggtaaa aaacctgggt taggggtgtg gttcaccttc aaaatgttct atttaacaac  
2461 tgggtcatgt gcatctgggt taggaagttt tttctaccat aagtgacacc aataaatggt  
2521 tgttatttac actggtcaaa aaaaaaaaaa aaaa

SEQ ID NO: 6

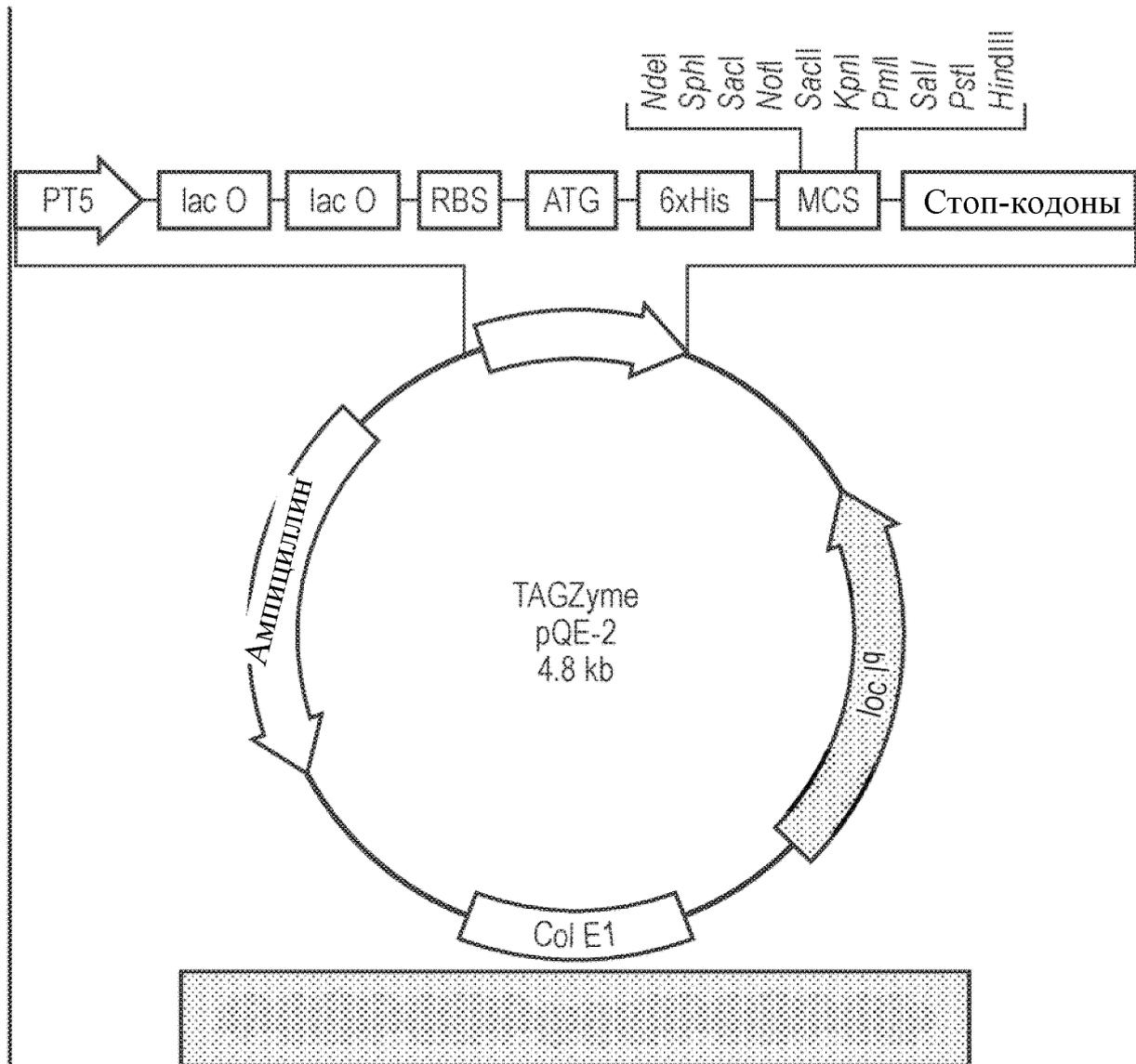
**ФИГ. 2 (Продолжение)**

## His-меченый ВiР аналог, экспрессируемый плазмидной pQE2

10            20            30            40            50            60  
 МКННННННННМ RAEEDKKED VGTVVGIDLG TTYSCVGVFK NGRVEI IAND QGNRITPSYV  
  
70            80            90            100            110            120  
 AFTPEGERLI GDAAKNQLTS NPENTVFDAK RLIGRTWNDP SVQQDIKFLP FKVVEKKTКP  
  
130            140            150            160            170            180  
 YIQVDIGGGQ TKTFAPEEIS AMVLTKMKET AEAYLGKKVT HAVVTVPAYF NDAQRQATKD  
  
190            200            210            220            230            240  
 AGTIAGLNVM RIINEPTAAA IAYGLDKREG EKNILVFDLG GGTFDVSLLT IDNGVFEVVA  
  
250            260            270            280            290            300  
 TNGDTHLGGE DFDQRVMEHF IKLYKKKTGK DVRKDNRAVQ KLRREVEKAK RALSSQHQAR  
  
310            320            330            340            350            360  
 IEIESFYEGE DFSETLTRAK FEELNMDLFR STMKPVQKVL ESDLKKSDI DEIVLVGGST  
  
370            380            390            400            410            420  
 RIPKIQQLVK EFFNGKEPSR GINPDEAVAY GAAVQAGVLS GDQDTGDLVL LDVCPLTLGI  
  
430            440            450            460            470            480  
 ETVGGVMTKL IPRNTVVPTK KSQIFSTASD NQPTVTIKVY EGERPLTKDN HLLGTFDLTG  
  
490            500            510            520            530            540  
 IPPAPRGVPQ IEVTFEIDVN GILRVTAEDK GTGNKNKITI TNDQNRLTPE EIERMVNDAAE  
  
550            560            570            580            590            600  
 KFAEEDKCLK ERIDTRNELE SYAYSLKNQI GDKEKLGKGL SSEDKETMEK AVEEKIEWLE  
  
610            620            630            640  
 SHQDADIEDF KAKKKELEEI VQPIISKLYG SAGPPPTGEE DTAEKDEL

SEQ ID NO: 4

RAEEEDKKED VGTVVGIDLG TTYSVGVFK NGRVEIIAND QGNRITPSYV  
AFTPEGERLI GDAAKNQLTS NPENTVFDAK RLIGRTWNDP SVQQDIKFLP FKVVEKKTKE  
YIQVDIGGGQ TKTFAPEEIS AMVLTKMKET AEAYLGKKVT HAVVTVPAYF NDAQRQATKD  
AGTIAGLNVN RIINEPTAAA IAYGLDKREG EKNILVFDLG GGTFDVSLLT IDNGVFEVVA  
TNGDTHLGGE DFDQRVMEHF IKLYKKKTGK DVRKDNRAVQ KLRREVEKAK RALSSQHQR  
IEIESFYEGE DFSETLTRAK FEELNMDLFR STMKPVQKVL ESDDLKSDI DEIVLVGGST  
RIPKIQQLVK EFFNGKEPSR GINPDEAVAY GAAVQAGVLS GDQDTGDLVL LDVCPLTLGI  
ETVGGVMTKL IPRNTVVPTK KSQIFSTASD NQPTVTIKVY EGERPLTKDN HLLGTFDLTG  
IPPAPRGVPQ IEVTFEIDVN GILRVTAEDK GTGNKNKITI TNDQNRLTPE EIERMVNDAE  
KFAEEDKCLK ERIDTRNELE SYAYSLKNQI GDKEKLGKGL SSEDKETMEK AVEEKIEWLE  
SHQDADIEDF KAKKKELEEI VQPIISKLYG SAGPPPTGEE DTAEKDEL  
SEQ ID NO: 3



ФИГ. 5А

SEQ ID NO: 8

attgtgagcggataacaatttcacacagaattcattaaagaggagaaattaactatgaaa  
catcaccatcaccatcaccatgatgcgggccgaggaggaggacaagaaggaggacgtgggc  
acggtggtcggcatcgacctggggaccacactcctgcgtcggcgtgttcaagaacggc  
cgcgtggagatcatcgccaacgatcagggcaaccgcatcacgccgtcctatgtcgccttc  
actcctgaaggggaacgtctgattggcgatgccgccaagaaccagctcacctccaacccc  
gagaacacgggtctttgacgccaagcggctcatcggccgcacgtggaatgacctgtctgtg  
cagcaggacatcaagttcttgccgttcaaggtggttgaaaagaaaactaaaccatacatt  
caagttgatattggaggtgggcaaacaaagacatttgcctcctgaagaaatcttgcctatg  
gttctcactaaaatgaaagaaaccgctgaggcttatttgggaaagaaggttacctatgca  
gttggtactgtaccagcctattttaatgatgcccaacgcccaagcaaccaagacgctgga  
actattgctggcctaaatgttatgaggatcatcaacgagcctacggcagctgctattgct  
tatggcctggataagagggagggggagaagaacatcctggtgtttgacctgggtggcggga  
accttcgatgtgtctctctcaccattgacaatggtgtcttcgaagttgtggccactaat  
ggagatactcatctgggtggagaagactttgaccagcgtgtcatggaacacttcatcaaa  
ctgtacaaaaagaagacgggcaaatgatgtcaggaaagacaatagagctgtgcagaaactc  
cggcgcgaggtagaaaaggccaaacgggccctgtctctcagcatcaagcaagaattgaa  
attgagtccttctatgaaggagaagacttttctgagaccctgactcgggccaatattgaa  
gagctcaacatggatctgttccggtctactatgaagcccgtccagaaagtgttggaagat  
tctgatttgaagaagtctgatattgatgaaattgttcttgttggtggctcgactcgaatt  
ccaaagattcagcaactggttaaagagttcttcaatggcaaggaacctcccgtggcata  
aaccagatgaagctgtagcgtatggtgctgctgtccaggctggtgtgctctctggtgat  
caagatacaggtgacctggtactgcttgatgatgtccccttacacttgggtattgaaact  
gtgggaggtgtcatgaccaaactgattccaaggaacacagtggtgcctaccaagaagtct  
cagatctttctacagcttctgataatcaaccaactgttacaatcaaggtctatgaaggt  
gaaagaccctgacaaaagacaatcatcttctgggtacatttgatctgactggaattcct  
cctgctcctcgtggggtcccacagattgaagtcacctttgagatagatgtgaatggtatt  
cttcgagtgacagctgaagacaagggtaacaggggaacaaaaataagatcacaatcaccaat  
gaccagaatcgctgacacctgaagaaatcgaaaggatggttaatgatgctgagaagttt  
gctgaggaagacaaaaagctcaaggagcgcattgatactagaaatgagttggaaagctat  
gcctattctctaagaatcagattggagataaagaaaagctgggaggtaaactttcctct  
gaagataaggagaccatggaaaaagctgtagaagaaaagattgaaatggctggaaagccac  
caagatgctgacattgaagacttcaaagctaaagaagaaggaactggaagaaattgttcaa  
ccaattatcagcaaacctctatggaagtgtagggccctcccccaactggtgaagaggataca  
gcagaaaaagatgagttgtaggcggccggtaccacgctgtcgacctgcagccaagct

**ФИГ. 5В**



345 LKKS DIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGAAV 394  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 351 LKKS DIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGAAV 400  
 . . . . .  
 395 QAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLIPRNTVVPTKKSQI 444  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 401 QAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLIPRNTVVPTKKSQI 450  
 . . . . .  
 445 FSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPQIEVT 494  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 451 FSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPQIEVT 500  
 . . . . .  
 495 FEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITITNDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAE 544  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 501 FEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITITNDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAE 550  
 . . . . .  
 545 EDKCLKERIDTRNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKETMEKAVEE 594  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 551 EDKCLKERIDTRNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKETMEKAVEE 600  
 . . . . .  
 595 KIEWLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAE 644  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 601 KIEWLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAE 650  
  
 645 KDEL\* 649  
 |||||  
 651 KDEL\* 655

**ФИГ. 6 (Продолжение)**

10/26

<400> SEQUENCE: 1

Met	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Val	Val	Gly	Ile	Asp	
1				5					10					15		
Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Gly	Val	Phe	Lys	Asn	Gly	Arg	Val	
			20					25					30			
Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	
		35					40					45				
Ala	Phe	Thr	Pro	Glu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	
	50					55					60					
Gln	Leu	Thr	Ser	Asn	Pro	Glu	Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	
65					70					75					80	
Ile	Gly	Arg	Thr	Trp	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Phe	
				85					90					95		
Leu	Pro	Phe	Lys	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Tyr	Ile	Gln	Val	
			100					105						110		
Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	
		115					120					125				
Ala	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	
	130					135					140					
Lys	Lys	Val	Thr	His	Ala	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	
145					150					155					160	
Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	
				165					170					175		
Val	Met	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	
			180					185					190			
Leu	Asp	Lys	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Phe	Asp	Leu	Gly	
		195					200					205				
Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Leu	Thr	Ile	Asp	Asn	Gly	Val	Phe	
	210					215					220					
Glu	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	
225					230					235					240	
Asp	Gln	Arg	Val	Met	Glu	His	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Thr	
				245					250						255	
Gly	Lys	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Asn	Arg	Ala	Val	Gln	Lys	Leu	Arg	Arg	
			260					265					270			
Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Gln	Ala	Arg	
		275					280					285				
Ile	Glu	Ile	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Gly	Glu	Asp	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	
	290					295					300					
Thr	Arg	Ala	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Asn	Met	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	
305					310					315					320	

ФИГ. 7

11/26

Met	Lys	Pro	Val	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser
				325					330					335	
Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys
			340					345					350		
Ile	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Phe	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Arg
		355					360					365			
Gly	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala
	370					375					380				
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Asp
385					390					395					400
Val	Cys	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ile	Glu	Thr	Val	Gly	Gly	Val	Met	Thr
				405					410					415	
Lys	Leu	Ile	Pro	Arg	Asn	Thr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	Gln	Ile
			420					425					430		
Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Pro	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Val	Tyr
		435					440					445			
Glu	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Leu	Gly	Thr	Phe
	450					455					460				
Asp	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu
465					470					475					480
Val	Thr	Phe	Glu	Ile	Asp	Val	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Glu
				485					490					495	
Asp	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln
			500					505					510		
Asn	Arg	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Asn	Asp	Ala	Glu
		515					520					525			
Lys	Phe	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Asp	Thr	Arg
	530					535					540				
Asn	Glu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln	Ile	Gly	Asp
545					550					555					560
Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys	Glu	Thr	Met
				565					570					575	
Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Trp	Leu	Glu	Ser	His	Gln	Asp
			580					585					590		
Ala	Asp	Ile	Glu	Asp	Phe	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Ile
		595					600					605			
Val	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro
	610					615					620				
Thr	Gly	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu	Leu	His	His	His	His	His	His	
625					630						635				

**ФИГ. 7 (Продолжение)**

&lt;400&gt; SEQUENCE: 2

Met	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Val	Val	Gly	Ile	Asp
1				5					10					15	
Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Gly	Val	Phe	Lys	Asn	Gly	Arg	Val
			20					25					30		
Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Ile	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val
		35					40					45			
Ala	Phe	Thr	Pro	Glu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn
	50					55					60				
Gln	Leu	Thr	Ser	Asn	Pro	Glu	Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu
65					70					75					80
Ile	Gly	Arg	Thr	Trp	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Gln	Gln	Asp	Ile	Lys	Phe
				85					90					95	
Leu	Pro	Phe	Lys	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Tyr	Ile	Gln	Val
			100					105					110		
Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser
		115					120					125			
Ala	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly
	130					135					140				
Lys	Lys	Val	Thr	His	Ala	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp
145					150					155					160
Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn
				165					170					175	
Val	Met	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly
			180					185					190		
Leu	Asp	Lys	Arg	Glu	Gly	Glu	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Phe	Asp	Leu	Gly
		195					200					205			
Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Leu	Thr	Ile	Asp	Asn	Gly	Val	Phe
	210					215					220				
Glu	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe
225					230					235					240
Asp	Gln	Arg	Val	Met	Glu	His	Phe	Ile	Lys	Leu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Thr
				245					250						255
Gly	Lys	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Asn	Arg	Ala	Val	Gln	Lys	Leu	Arg	Arg
			260					265					270		
Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Gln	Ala	Arg
		275					280					285			
Ile	Glu	Ile	Glu	Ser	Phe	Tyr	Glu	Gly	Glu	Asp	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu
	290					295					300				
Thr	Arg	Ala	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Asn	Met	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr
305					310					315					320

Met	Lys	Pro	Val	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser
				325					330					335	
Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys
			340					345					350		
Ile	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Phe	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Arg
		355					360					365			
Gly	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala
	370					375					380				
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Asp
385					390					395					400
Val	Cys	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Ile	Glu	Thr	Val	Gly	Gly	Val	Met	Thr
				405					410					415	
Lys	Leu	Ile	Pro	Arg	Asn	Thr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	Gln	Ile
			420					425					430		
Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Asp	Asn	Gln	Pro	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Val	Tyr
		435					440					445			
Glu	Gly	Glu	Arg	Pro	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Leu	Gly	Thr	Phe
	450					455					460				
Asp	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu
465					470					475					480
Val	Thr	Phe	Glu	Ile	Asp	Val	Asn	Gly	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Glu
			485					490						495	
Asp	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn	Lys	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln
			500					505					510		
Asn	Arg	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Asn	Asp	Ala	Glu
		515					520					525			
Lys	Phe	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Asp	Thr	Arg
	530					535				540					
Asn	Glu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Gln	Ile	Gly	Asp
545					550					555					560
Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Lys	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys	Glu	Thr	Met
				565					570					575	
Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Trp	Leu	Glu	Ser	His	Gln	Asp
			580					585					590		
Ala	Asp	Ile	Glu	Asp	Phe	Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Ile
		595					600					605			
Val	Gln	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro
	610					615					620				
Thr	Gly	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu	Leu							
625					630										

ФИГ. 8 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

MEEDKKED VGTVVGIDLG TTYSVGVFK NGRVEIAND QGNRITPSYV

AFTPEGERLI GDAAKNQLTS NPENTVFDK RLIQRTWVNDP SVQQDIKFLP FKVVEKKTCP

YIQVDIGGGQ TKTFAPEEIS AMVLTKMKET AEAYLGKKVT HAVVTVPAYF NDAQRQATKD

AGTIAGLNVN RIINEPTAAA IAYGLDKREG EKNILVFDLG GGTFDVSLLT IDNGVFEVVA

TNGDTHLGGE DFDQRVMEHF IKLYKKKTGK DVRKDNRAVQ KLRREVEKAK RALSSQHQR

IEIESFYEGE DFSETLTRAK FEELNMDLFR STMKPVQKVL ESDDLKSDI DEIVLVGGST

RIPKIQQLVK EFFNGKEPSR GINPDEAVAY GAAVQAGVLS GDQDTGDLVL LDVCPLTLGI

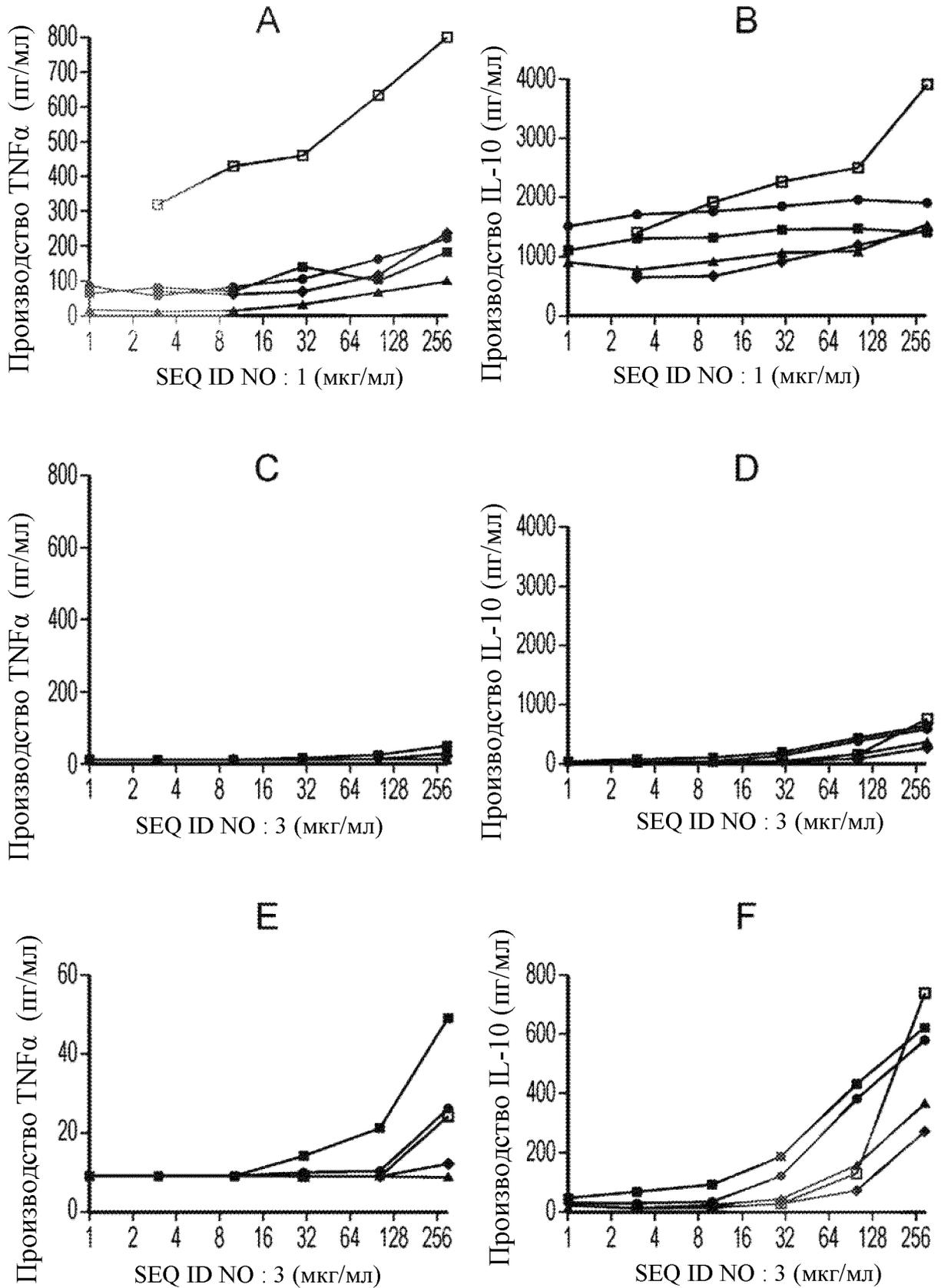
ETVGGVMTKL IPRNTVVPTK KSQIFSTASD NQPTVTIKVY EGERPLTKDN HLLGTFDLTG

IPPAPRGVPQ IEVTFEIDVN GILRVTAEDK GTGNKNKITI TNDQNRLTPE EIERMVNDAE

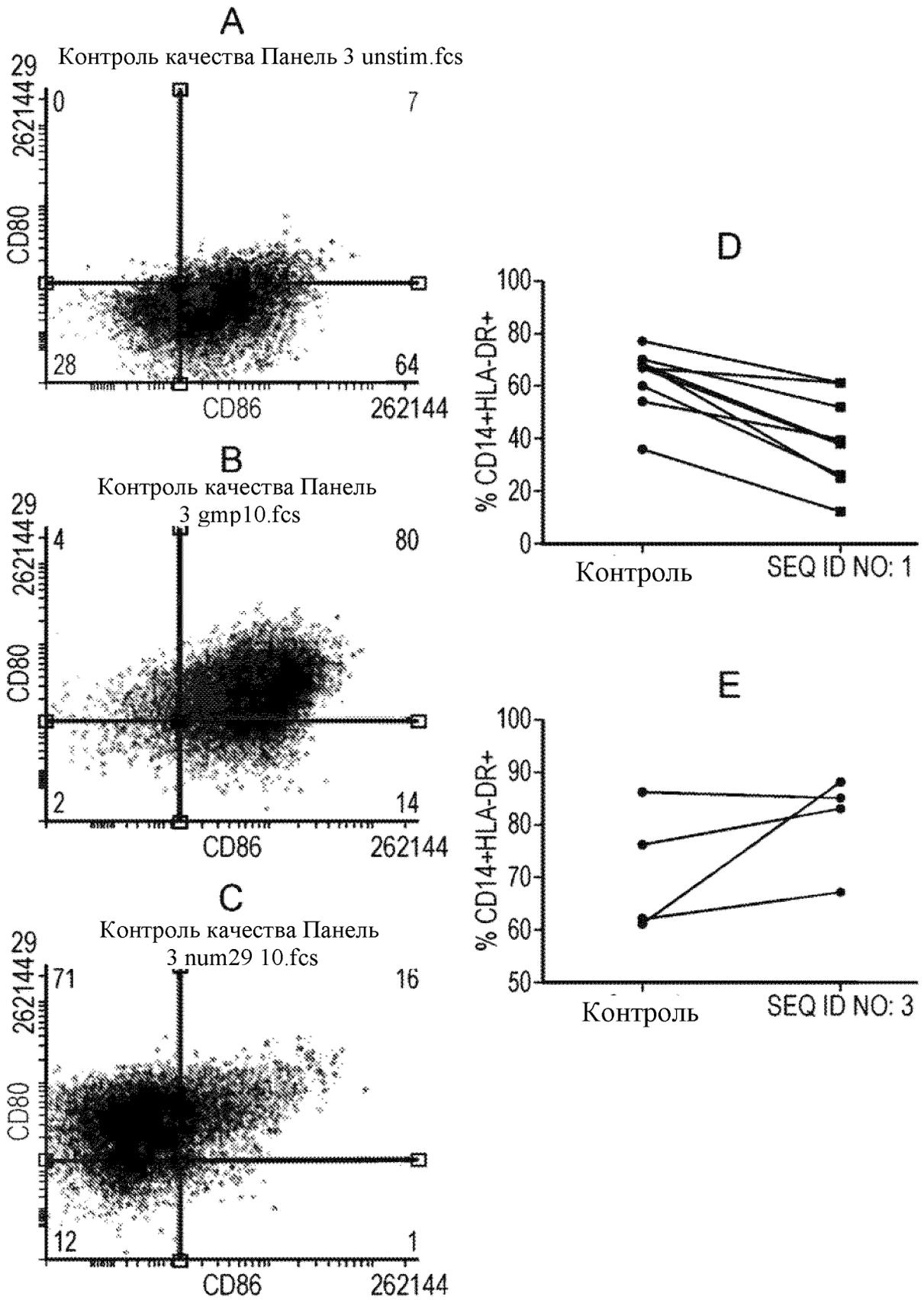
KFAEEDKKLK ERIDTRNELE SYAYSLKNQI GDKEKLGKGL SSEDKETMEK AVEEKIEWLE

SHQDADIEDF KAKKKELEEI VQPIISKLYG SAGPPPTGEE DTAEKDEL

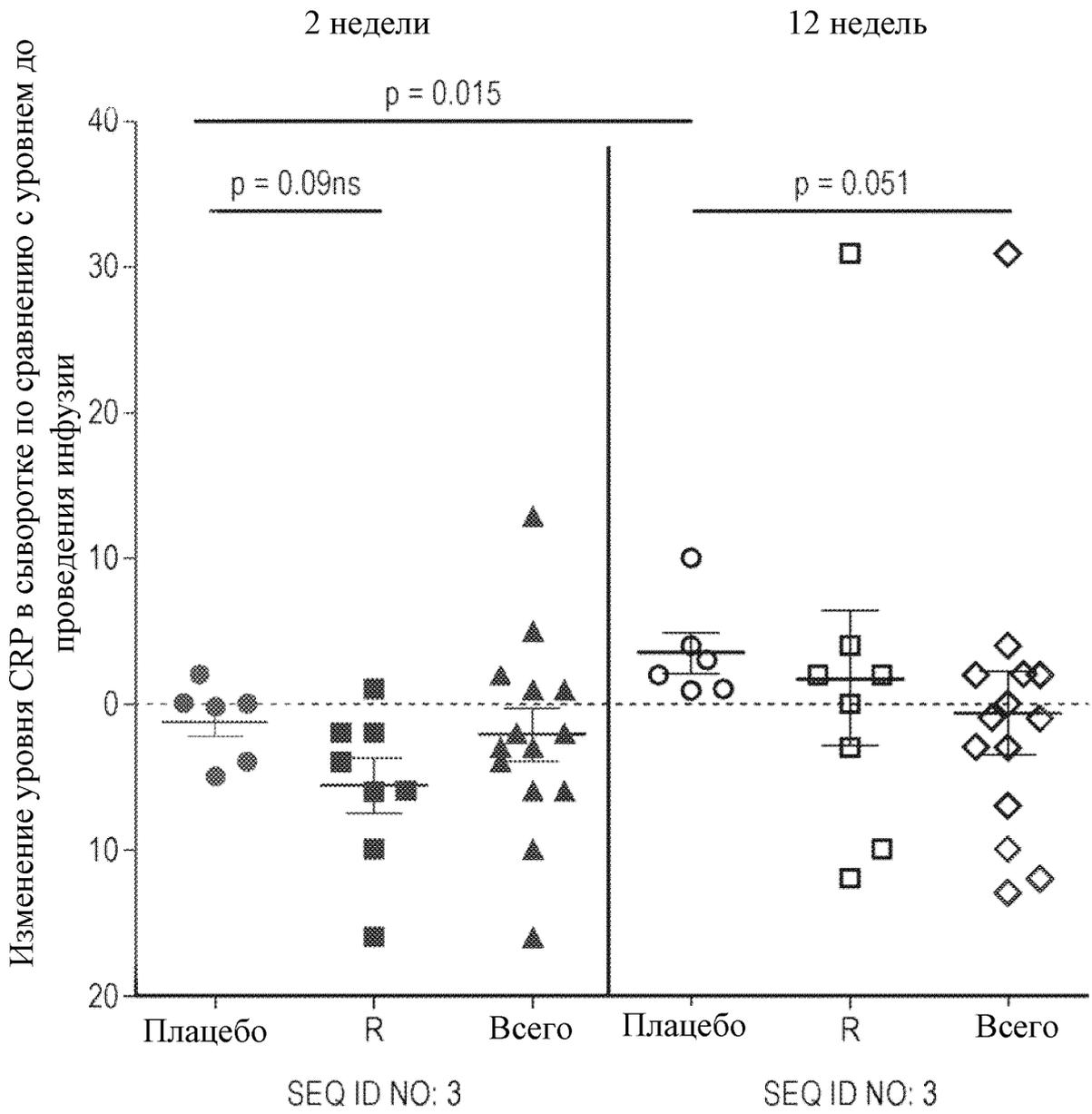
SEQ ID NO: 7



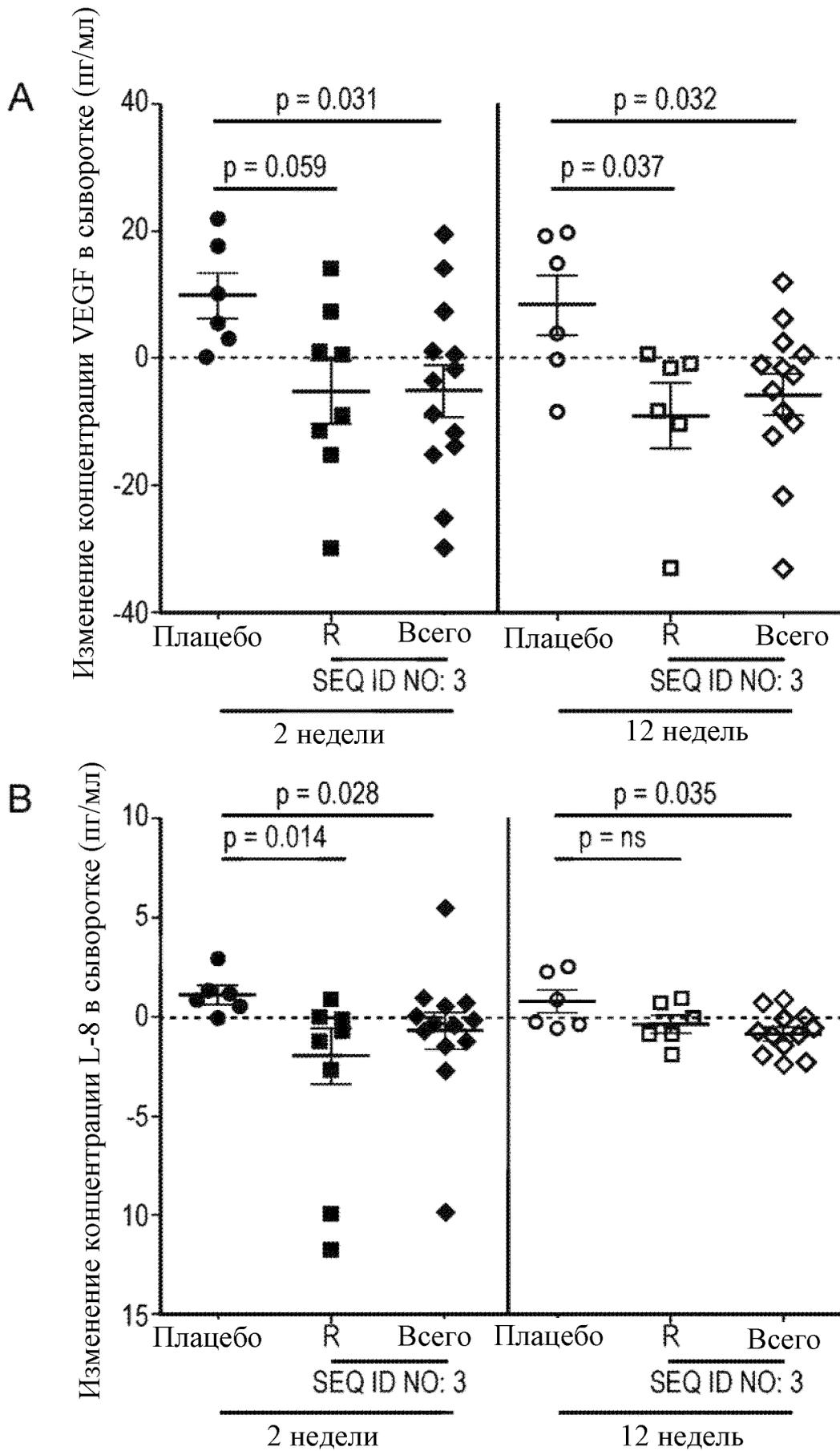
ФИГ. 10



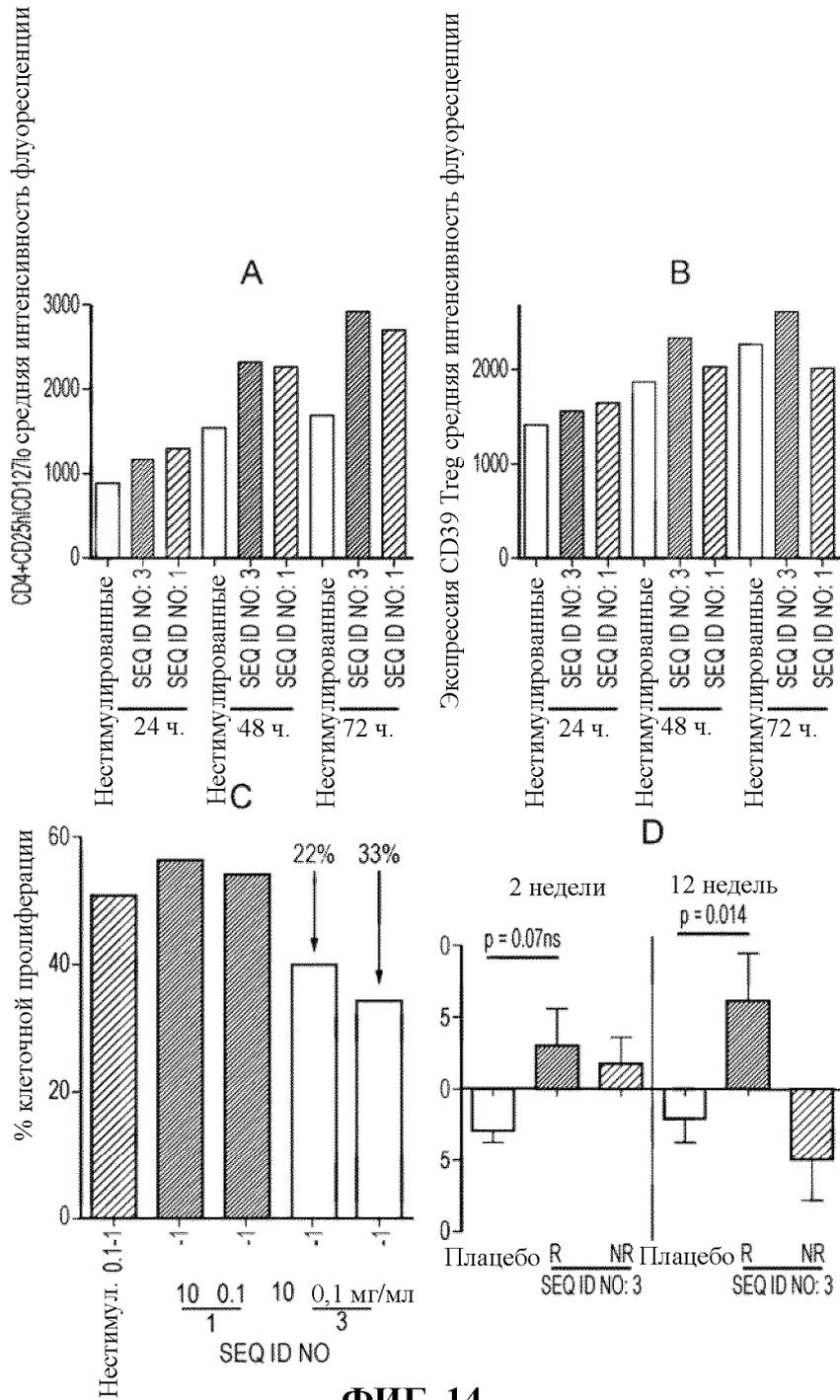
ФИГ. 11



**ФИГ. 12**

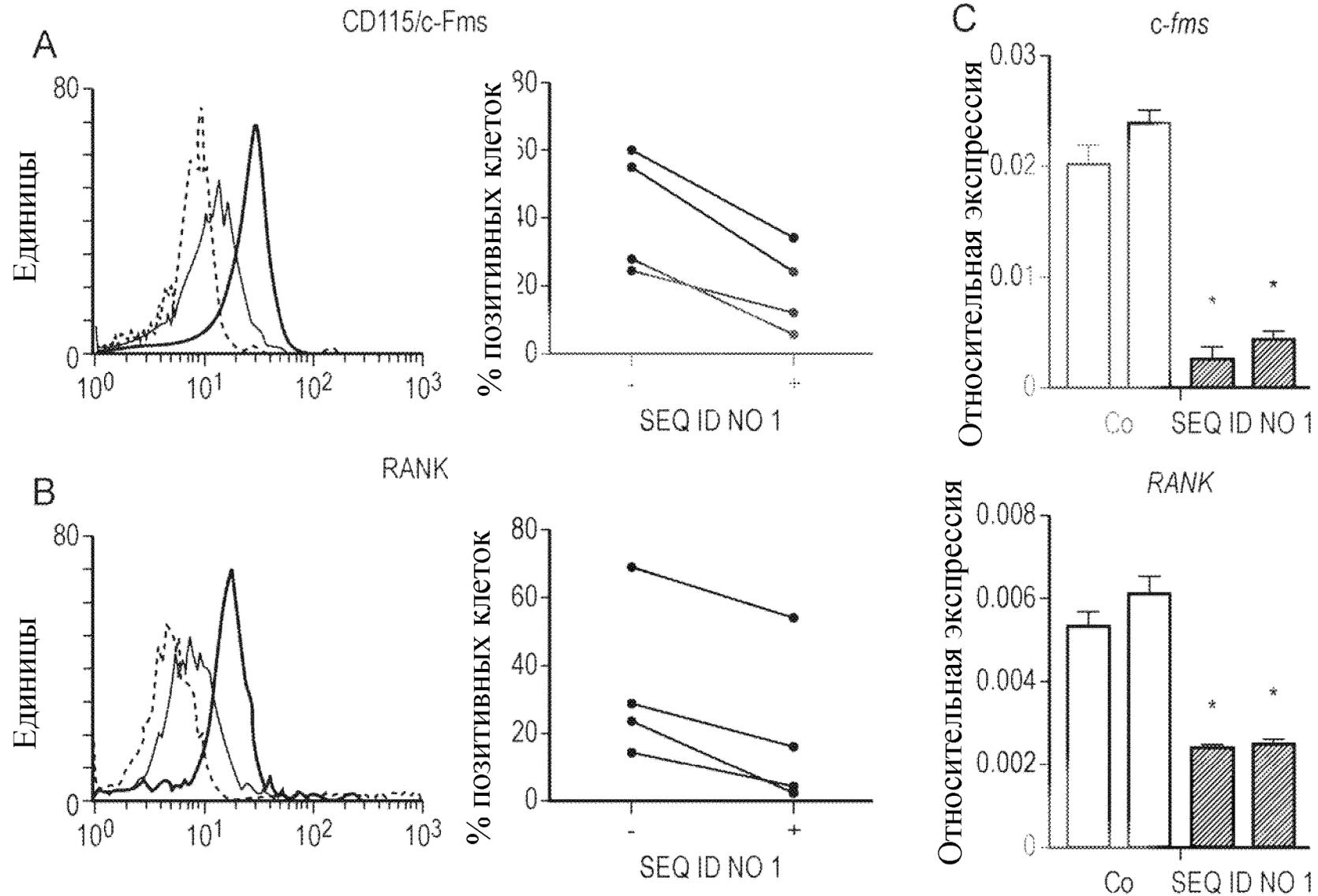


**ФИГ. 13**

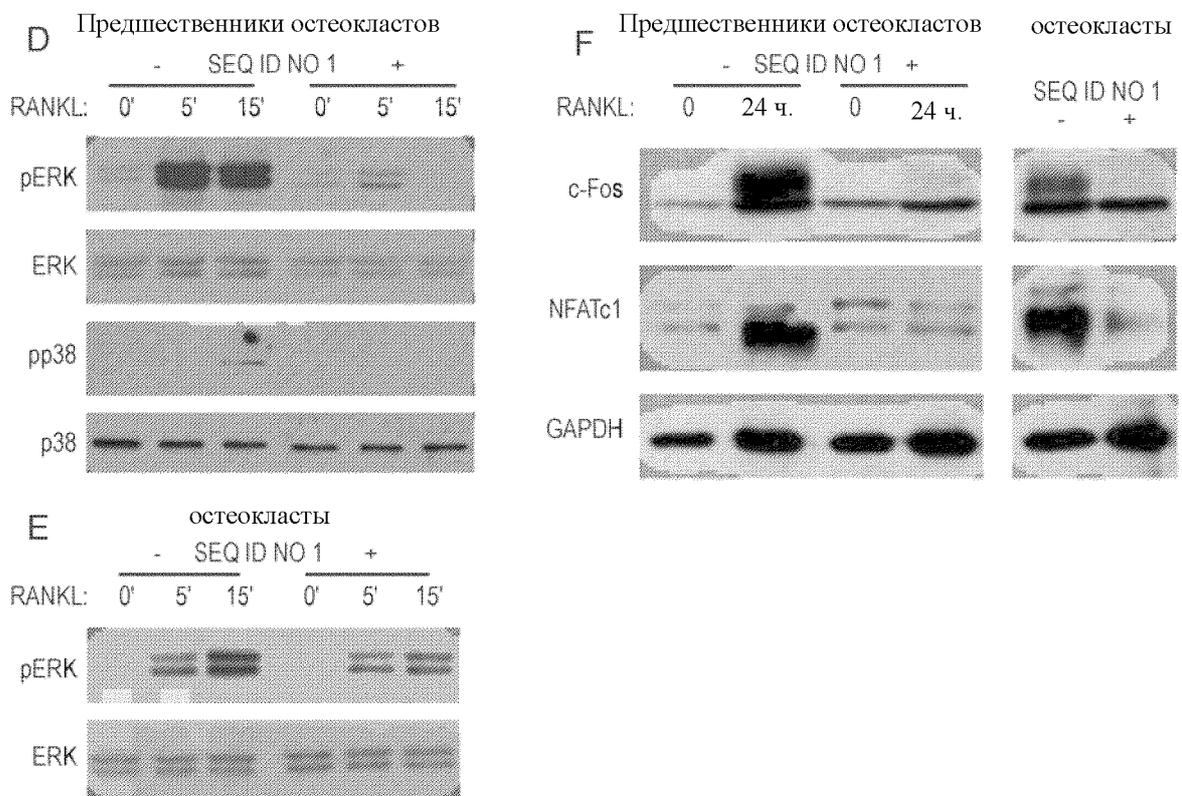


**ФИГ. 14**

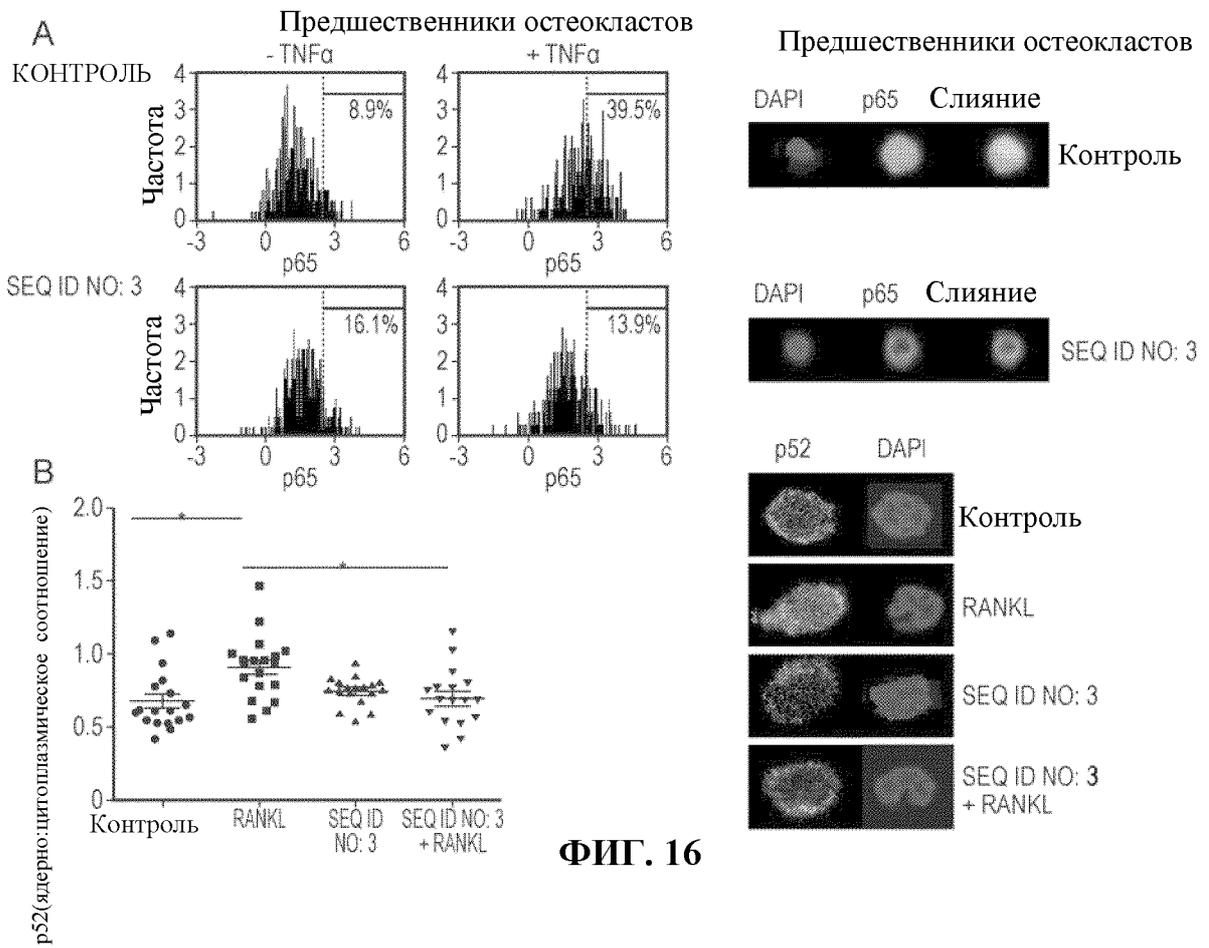
**ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)**



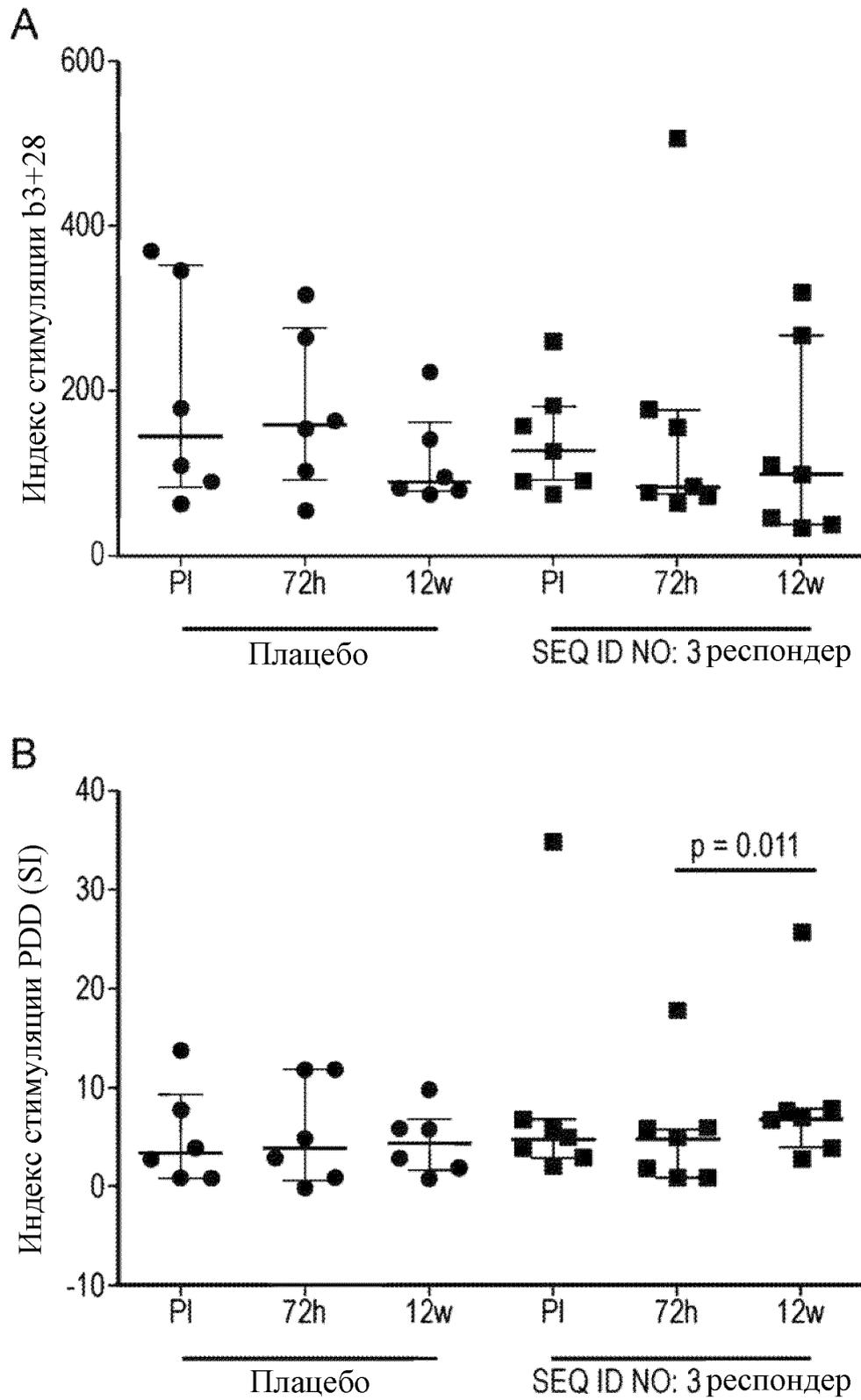
**ФИГ. 15**



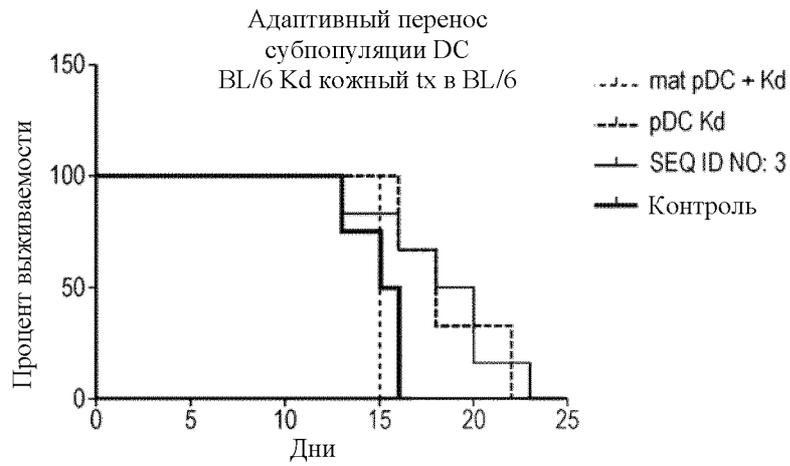
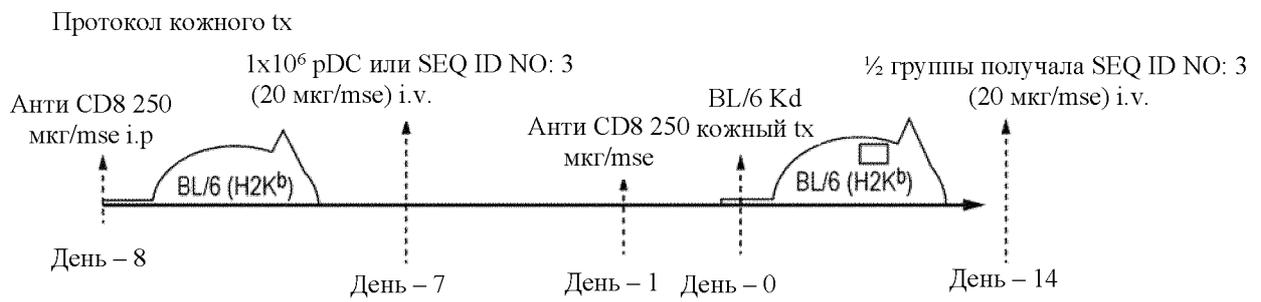
ФИГ. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



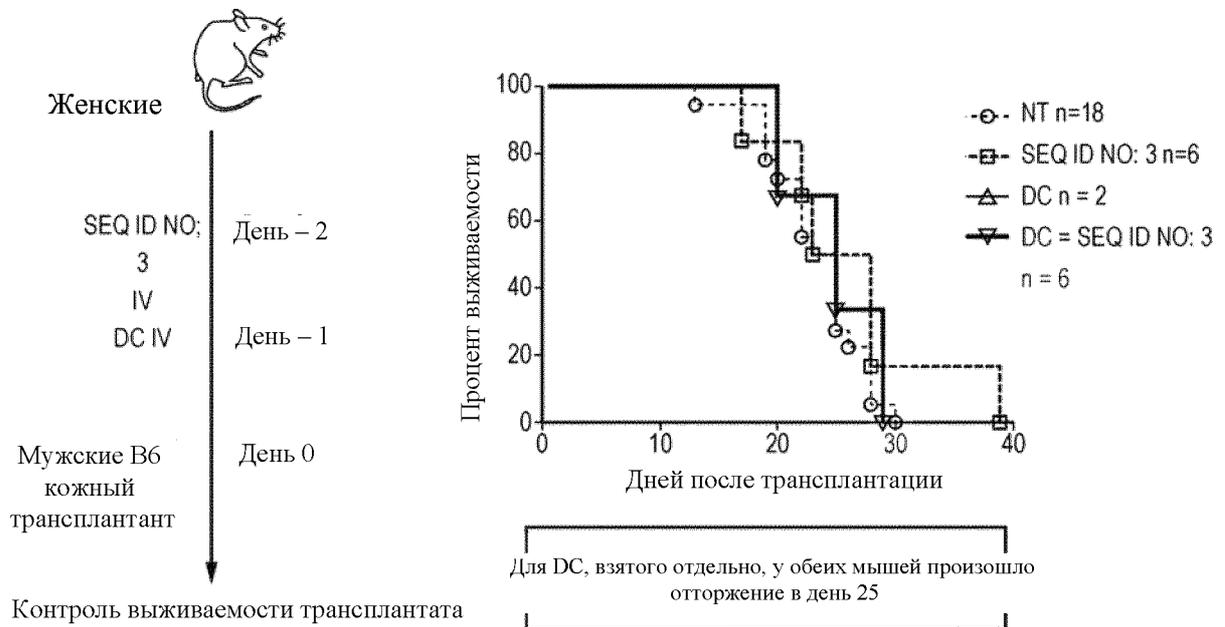
ФИГ. 16



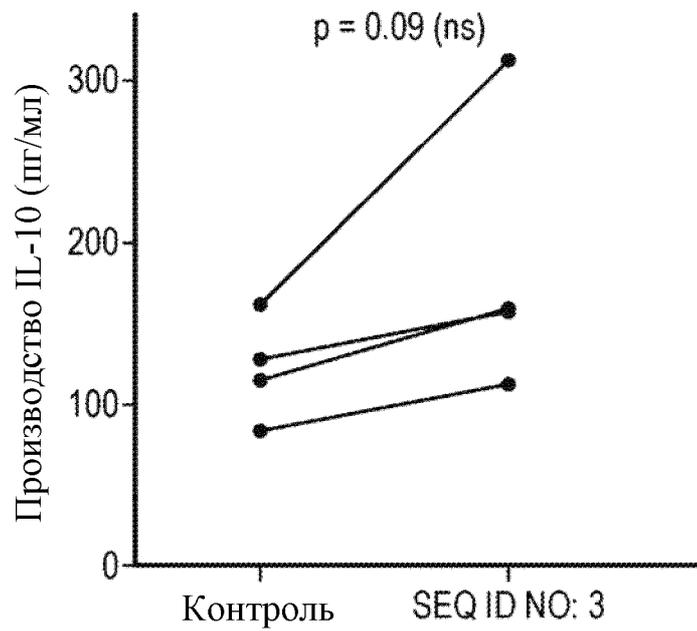
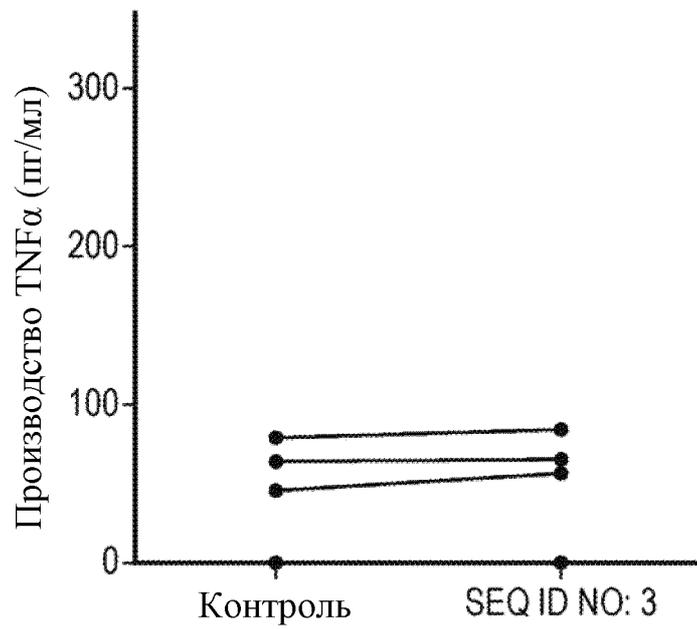
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20